

**Einfluß verschiedener Gap Junction-Kanäle auf das
Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsverhalten
der humanen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Alexandra Gellhaus

aus Oldenburg

April 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Winterhager

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. H. E. Hagenmaier

Tag der mündlichen Prüfung: 06.08.2003

Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei:

Frau Prof. Dr. Elke Winterhager für die Vergabe der interessanten Themenstellung, für die Möglichkeit der Teilnahme an vielen Kongressen, auf denen ich meine Ergebnisse präsentieren konnte, und für die stete Diskussionsbereitschaft, intensive Unterstützung und Motivation während der Durchführung dieser Arbeit,

Ruth Grümmer und Heinz-Dieter Gabriel für die wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen und für die anfängliche Betreuung meiner Arbeit bezüglich der Nacktmausversuche und der Generierung der Connexin-Konstrukte sowie der Einführung in die Zellkultur- und Transfektionstechniken,

Gabriele Sehn, Georgia Rauter, Natalie Knipp, Eva Kusch und Daniela Kottmann für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit, vor allem in der Zellkultur, bei den Northern-Blot-Hybridisierungen und den histologischen Arbeiten,

Sven Propson für die Durchführung der *in vitro*-Proliferationsmessungen der Zelltransfektanten,

Dave Kittel für die geduldige Hilfe bei der Bildbearbeitung am Computer und Peter Babioch für die schnelle Ausführung von Fotoarbeiten und „Sitzungen am Laserscan-Mikroskop“,

Jan Dürig für die Unterstützung bei den FACS-Analysen, für die Bereitstellung des FACS-Gerätes und für ausgiebige Diskussionen über so vielerlei Dinge,

Karen Maass für die Bereitstellung des trunkierten Cx43-Konstruktes für die Transfektionsexperimente,

Dr. Ludger Klein-Hitpass für die Durchführung der Gene-Array-Analysen und den Hilfen bei der Auswertung,

meinen „Mitreitern“ Yvonne Janssen und Mark Kibschull für eine sehr gute Zusammenarbeit während dieser Zeit mit vielen nützlichen Tips bezüglich der Laborarbeit, für die vielen netten, lustigen Stunden während und nach der Arbeit (-besonders auf zahlreichen Kongressen-) und für gemeinsame Überwindungen so mancher „Krisen“,

Beate Gramsch für die vielen klärenden E-Mails und Telefongespräche, für die Hilfen in Computerfragen sowie statistischen Analysen und das gemeinsame Plaudern an netten Abenden,

allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und des gesamten Instituts für Anatomie für das sehr gute Arbeitsklima und die jederzeit gewährten Hilfestellungen in Laborfragen,

meinen Freunden für die zahlreichen aufmunternden Gespräche,

meinen Eltern und meinem Freund für die stets aufgebrachte Geduld und liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeitszeit, die mir über manchen Tiefpunkt hinweg geholfen hat und dafür, daß ohne sie diese Arbeit ungleich schwieriger gewesen wäre.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Dr. Mildred Scheel Stiftung für Krebsforschung / Deutsche Krebshilfe, Projekt 10-1488-WI 2, gefördert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gap Junctions	1
1.1.1	Aufbau und Struktur von Gap Junctions	1
1.1.2	Gewebespezifische Expression und Funktionsanalyse von Connexin-Genen	4
1.1.3	Physiologie der Gap Junction-Kanäle	5
1.2	NOV, ein Wachstumsregulator der CCN-Familie	6
1.3	Gap Junctions und Trophoblast	9
1.4	Die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3, ein Modell für den humanen proliferativen Trophoblasten	12
1.5	Gap Junctions und Tumorgenese	13
1.6	Gap Junctions und Invasion	15
2	Zielsetzung der Arbeit	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	19
3.2	Häufig verwendete Lösungen, Puffer und Medien	20
3.3	Molekularbiologische Arbeiten	20
3.3.1	Vektoren	20
3.3.2	Transformation elektro-kompetenter Bakterien – Elektroporation	22
3.3.3	Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	23
3.3.4	DNA	23
3.3.4.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	23
3.3.4.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	23
3.3.4.3	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	24
3.3.4.4	Dephosphorylierung von DNA	24
3.3.4.5	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Ligase	24
3.3.4.6	Auffüllen von DNA-Fragmenten mit 5'-überstehenden Enden (Klenow-Behandlung)	24
3.3.4.7	Auftrennung und Isolierung von DNA	24
3.3.4.8	Sequenzierung von DNA	25
3.3.4.9	Fällung von Nukleinsäuren	25
3.3.4.10	Konzentrationsbestimmung von DNA / RNA	25
3.3.5	RNA	25

3.3.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	25
3.3.5.2	Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen für die Gene-Array-Analyse	25
3.3.5.3	Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen	26
3.3.5.4	Northern-Blot-Analyse	26
3.3.6	Semiquantitative RT-PCR.....	27
3.3.6.1	Verwendete Oligonukleotid-Primer und deren Charakteristika.....	27
3.3.6.2	DNase-Behandlung der Gesamt-RNA vor der Reversen Transkription	28
3.3.6.3	Reverse Transkription	28
3.3.6.4	PCR.....	28
3.3.7	Gene-Array-Analyse	29
3.3.7.1	Absolute und vergleichende Analyse	30
3.3.7.2	Hierarchisches Clustering und statistische Analyse.....	30
3.4	Zellbiologische Methoden	30
3.4.1	Zelllinien und Zellkulturmedien	30
3.4.2	Kultivierungsbedingungen.....	31
3.4.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
3.4.4	Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	32
3.4.4.1	Stabile Transfektion.....	32
3.4.4.2	Optimierung der Antibiotika-Konzentration für die Selektion transfizierter Zellen.....	33
3.4.4.3	Transiente Transfektion.....	33
3.4.4.4	Kontrolle der basalen Aktivität des reversen Transaktivators (rtTA) im Luziferase-Assay.....	33
3.4.5	<i>In vitro</i> -Proliferationsassay.....	34
3.4.6	β hCG-Bestimmung im Überstand von kultivierten Zellen	34
3.4.7	Farbstoff-Transfer-Assay und FACS-Analyse zur quantitativen Ermittlung der Zellkopplung	34
3.5	Histologie	35
3.5.1	Herstellung, Fixierung und HE-Färbung von Präparaten.....	35
3.6	Immunhistochemie	36
3.6.1	Antikörper.....	36
3.6.2	Indirekte immunhistochemische Nachweisverfahren	37
3.6.2.1	Indirekte Immunhistochemie mit Fluoreszenzmarkierung	37
3.6.2.2	Indirekte Immunhistochemie mit StreptAvidin-Biotin-Färbung.....	37
3.7	Versuchstiere.....	38
3.7.1	Tumorstadium in Nacktmäusen.....	38
3.8	Statistische Auswertungen	38

4	Ergebnisse	39
4.1	Charakterisierung der generierten Connexin-Zelltransfektanten	39
4.1.1	Etablierung einer induzierbaren Connexin-Genexpression in Jeg3-Zellen mit dem Tet-On-System.....	39
4.1.2	Generierung von Jeg3-Cx-Transfektanten mit dem zellspezifischen α hCG- Promotor	42
4.1.3	Nachweis der Connexin-Expression in Connexin-Transfektanten.....	42
4.1.3.1	Induzierbare Connexin-Expression in Tet-Transfektanten	43
4.1.3.2	Connexin-Expression in α hCG-Promotor-Transfektanten.....	47
4.1.4	Kinetik der Connexin-Expression in Tet-Transfektanten.....	48
4.1.5	Quantitative Bestimmung der funktionellen Zellkopplung über den Farbstoff- Transfer-Assay und FACS-Analyse	50
4.1.5.1	Homologe Kopplungsanalysen der Jeg3-Cx-Transfektanten.....	51
4.2	Heterologe Kopplungsanalysen.....	54
4.2.1	Analyse der Invasionseigenschaften der Jeg3-Cx-Transfektanten <i>in vitro</i>	54
4.3	Untersuchung der Zellphysiologie der Jeg3-Cx-Transfektanten.....	55
4.3.1	Analyse der Zellproliferation <i>in vitro</i>	55
4.3.2	Bestimmung der Expression und Sekretion von β hCG.....	58
4.4	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Jeg3-Cx-Transfektanten in Nacktmäusen.....	60
4.4.1	Nachweis der Connexin-Expression im Tumorgewebe	61
4.4.2	Charakterisierung des Invasionsverhaltens <i>in vivo</i>	63
4.4.3	Analyse des Tumorstwachstums <i>in vivo</i>	68
4.5	Gene-Array-Analysen zur Bestimmung der Genexpressionsmuster in Jeg3-Cx-Transfektanten	71
4.5.1	Hierarchische Cluster-Analysen der Genexpressionsmuster	72
4.5.2	Expression von NOV, ZO-1 und Occludin in Einzel-Paarvergleichen.....	74
4.5.3	Unterschiede in der Genexpression ermittelt durch multiple Paarvergleiche	76
4.6	Validierung der Gene, die auf eine differentielle Genexpression in den Gene-Arrays hinweisen	79
4.6.1	Untersuchung der Expression von Occludin und ZO-1 in Jeg3-Cx-Transfektanten	79
4.6.2	Untersuchung der Expression von NOV	81
4.6.2.1	Analyse der Expression von NOV in Jeg3-Cx-Transfektanten.....	81
4.6.2.2	Analyse der Expression von NOV in Jeg3-Cx-Tumoren	82
4.6.2.3	Immunhistochemische Analyse der Expression und Lokalisation von NOV in Jeg3-Cx-Transfektanten	83

4.6.2.4	Analyse der Expression von NOV in der reifen humanen Plazenta	86
5	Diskussion	88
5.1	Genexpressionssysteme: Tet-System und zellspezifischer α hCG-Promotor	88
5.2	Quantifizierung des Kopplungsgrades mit Hilfe der FACS-Analyse des Calcein-Transfers	91
5.2.1	Homologe Kopplungsanalysen der Jeg3-Cx-Transfektanten	92
5.3	Gap Junctions und Invasion	93
5.3.1	Charakterisierung der heterologen Kopplungsfähigkeit von Jeg3-Cx- Transfektanten mit Endothelzellen <i>in vitro</i>	93
5.3.2	Charakterisierung des Invasionsverhaltens der Jeg3-Cx-Transfektanten <i>in vivo</i>	95
5.4	Die Transfektion von Cx43 verändert das Proliferations- und Differenzierungs- verhalten der malignen Trophoblastzelllinie Jeg3 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	97
5.5	Cx-vermittelte Signalkaskade in Jeg3-Cx43-Transfektanten: Assoziation und mögliche Interaktion von Cx43 mit dem Wachstumsregulator NOV	101
5.6	Regulation der Gap Junction vermittelten Kommunikation und weitere mögliche Interaktionspartner von Connexinen aus den Gene-Array-Analysen	106
5.7	Ausblick	111
6	Zusammenfassung	112
7	Literaturverzeichnis	114
8	Anhang	127
8.1	Plasmidkarten der Vektoren	127
8.2	Zusammenstellung der Nacktmausversuche zur Analyse des Tumor- wachstums	131
8.3	Genlisten der Gene-Array-Auswertungen	132

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CT	C-terminale Domäne
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Cx	Connexin
CYR61	<i>cysteine-rich protein 61</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
db-cAMP	Dibutyryl zyklisches Adenosinmonophosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF-R	<i>epidermal growth factor</i> -Rezeptor
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FACS	fluoreszenzaktivierte Durchflußzytometrie
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
hCG	Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalaktopyranosid
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAV	<i>myeloblastosis associated virus</i>
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
M-MLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure

mRNA	<i>messenger</i> (Boten)-Ribonukleinsäure
n.b.	nicht beschrieben
NOV	<i>nephroblastoma overexpressed</i>
NT	N-terminale Region
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PP11	<i>placental protein 11</i>
PymT	<i>polyoma middle T</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rtetR	reverse Tet-Repressor
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
rtTA	reverse transkriptionale Transaktivator
SAP	Shrimps Alkalische Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Trypsin/EDTA
Tet	Tetrazyklin
tetO	Tet-Operator-Sequenz
T _m	Annealingtemperatur
tr	trunkiert
TRE	Tet ansprechendes Element
TRIS	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
TSP-1	<i>thrombospondin type 1 repeat</i>
3'-UTR	3'-untranslatierende Region
U	<i>unit</i>
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial</i> Cadherin
VWC	<i>Von Willebrand factor type C repeat</i>
w/v	Gewichtsprozent
WISP	<i>Wnt-1-induced secreted protein</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem
αhCG	α-Choriongonadotropin
βhCG	β-Choriongonadotropin

1 Einleitung

1.1 Gap Junctions

Eine koordinierte Interaktion zwischen Zellen ist die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung eines multizellulären Organismus. Dabei kann die Kommunikation sowohl über neuronale und endokrine Mechanismen (Neurotransmitter, Hormone, Mediatoren) als auch durch parakrine Signale sowie durch direkte Kommunikation der Zellen untereinander über interzelluläre Kanäle, den **Gap Junctions**, vermittelt werden. Gap Junctions sind Cluster von Kanälen zwischen benachbarten Zellen, die eine direkte Kommunikation über den Austausch von Ionen, kleinen Metaboliten (Glukose, Aminosäuren, Nukleotide) und sekundären Botenstoffen (Ca^{2+} -Ionen, cAMP, IP_3) bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa vermitteln. Sie kommen in nahezu allen Tierarten und vielen Geweben und Zellen mit Ausnahme von Spermien und dem adulten Skelettmuskel vor (Kumar und Gilula, 1996). Gap Junctions spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsprozessen, besonders in der frühen Entwicklung, und sind an der Erregungsausbreitung im Myokard, in der glatten Muskulatur und im zentralen Nervensystem (ZNS) beteiligt (Loewenstein, 1987; Paul, 1995). Veränderungen in der Verteilung, Expression und Funktion von Gap Junctions sind oft mit einer reduzierten Proliferationskontrolle und Tumorgenese assoziiert (Yamasaki et al., 1999). Mutationen in Gap Junction-Genen im humanen Genom führen zu Kommunikationsdefekten zwischen Zellen und verursachen dadurch schwere Störungen wie die X-chromosomale Form der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie (Bergoffen et al., 1993) oder eine erbliche, nicht syndromartige Form der Taubheit (Kelsell et al., 1997).

1.1.1 Aufbau und Struktur von Gap Junctions

Die Gap Junction-Proteine, **Connexine** (Cx), gehören zu einer Multigenfamilie homologer Membranproteine mit gegenwärtig 20 Mitgliedern im humanen Genom und 19 Mitgliedern im Maus-Genom (Übersicht: Willecke et al., 2002) (Tab. 1). Innexine bilden eine Familie von Gap Junction-Proteinen der Invertebraten. Diese besitzen eine ähnliche Topologie und Funktion im Vergleich zu den Connexinen, jedoch weisen sie keinerlei Sequenzübereinstimmungen auf (Phelan et al., 1998; Phelan und Starich, 2001).

Die Struktur der Gap Junction-Kanäle ist weitgehend aufgeklärt. Ein Kanal besteht aus zwei Hemikanälen von benachbarten Zellen, den **Connexonen** (Goodenough, 1974; Makowski et al., 1977). Ein Connexon durchspannt die Membran einer Zelle und besteht aus sechs regelmäßig um eine zentrale Pore angeordneten Transmembranproteinen, den **Connexinen** (Goodenough, 1976) (Abb. 1B, C). Eine dreidimensionale Connexon-Strukturanalyse ergab,

daß die Connexine in Form einer Rosette einen hydrophilen Kanal mit einem Innendurchmesser von 1-2 nm bilden (Perkins et al., 1997).

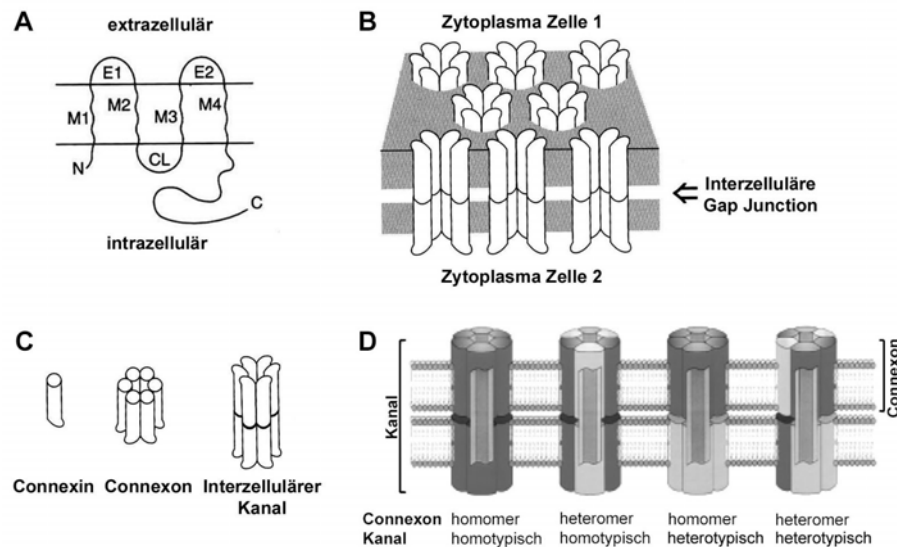


Abb. 1: Aufbau und Struktur von Gap Junctions. (A) Topologie eines Connexin-Proteins mit vier Transmembrandomänen (M1-M4), zwei extrazellulären Schleifen (E1, E2) und drei intrazellulären Regionen (N-Terminus (N), zytoplasmatische Schleife (CL) und C-Terminus (C)). (B) und (C) Modelldarstellung einer Gap Junction. (A-C: modifiziert nach Simon und Goodenough, 1998). (D) Schematische Darstellung der möglichen Zusammensetzung von Connexonen und Gap Junction-Kanälen (D: modifiziert nach Willecke et al., 2002). Näheres siehe Text.

Die Connexin-Isoformen werden nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht bezeichnet. Z.B. steht Cx32 für ein Connexin mit einem Molekulargewicht von 32 kDa. Hydrophobizitätsanalysen ergaben, daß Connexine als membrandurchspannende Proteine vier hydrophobe, α -helikale Transmembrandomänen besitzen. Diese werden durch drei hydrophile Schleifen (zwei extrazelluläre Schleifen und eine zytoplasmatische Schleife) verbunden. Ebenfalls hydrophil sind der kurze N-Terminus und der längere C-Terminus (Paul, 1986). In Abbildung 1A ist die Membrantopologie der Connexine anhand eines Schemas dargestellt. Sequenzanalysen verschiedener Connexine zeigten, daß sich hochkonservierte mit weniger stark konservierten Abschnitten abwechseln. Die zwei extrazellulären Schleifen, die Transmembrandomänen und der N-Terminus weisen die größten Sequenzhomologien auf. Am wenigsten konserviert sind die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus, deren Sequenzen für jedes Connexin spezifisch sind und vermutlich die unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der Gap Junctions bestimmen (Söhl et al., 2001; Willecke et al., 2002). Die Connexine werden in verschiedene Untergruppen (α , β , γ) in Bezug auf den Grad der Homologie und der Länge der zytoplasmatischen Schleife eingeteilt (vgl. Tab. 1; Söhl et al., 2001).

Tab. 1: Die Connexin-Multigenfamilie. Zusammenstellung der bisher identifizierten murinen Connexin-Gene, eine Einteilung in die drei Subgruppen (α , β , γ), Angabe der Länge des Proteins und des C-Terminus in Aminosäuren (AS) und das Hauptgewebe- bzw. Zellvorkommen. n. b., nicht beschrieben (zusammengestellt aus Willecke et al., 2002; Evans und Martin, 2002).

Connexin	Subgruppe	Protein (AS)	C-Terminus (AS)	Hauptgewebe- bzw. Zellvorkommen
Cx26	β	226	18	Leber, Gehirn, Plazenta, Haut, Innenohr
Cx29	-	258	50	myelinisierte Zellen (ZNS, PNS), Ischiasnerv
Cx30	β	261	55	Haut, Innenohr, Gehirn
Cx30.2	β	278	n. b.	n. b.
Cx30.3	β	266	65	Haut
Cx31	β	270	65	Haut, Plazenta
Cx31.1	β	271	70	Haut, Hoden
Cx32	β	283	75	Leber, Niere, Schwannzellen, Oligodendrozyten
Cx33	α	286	60	Hoden
Cx36	-	321	50	Gehirn, Retina
Cx37	α	333	105	Endothel, Lunge, Ovar
Cx39	-	364	n. b.	n. b.
Cx40	α	358	135	Herz, Endothel, Lunge
Cx43	α	382	155	ubiquitär: Herz, Gehirn, Haut, Uterus, Hoden usw.
Cx45	γ	396	150	Herz, Endothel, Neurone
Cx46	α	417	190	Augenlinse
Cx47	γ	437	155	Gehirn, Rückenmark
Cx50	α	441	210	Augenlinse
Cx57	α	505	275	Haut, Herz, Niere, Ovar

Je nachdem, ob gleichartige oder verschiedenartige Connexin-Moleküle am Aufbau der Connexone beteiligt sind, wird von **homo-** bzw. **heteromeren Connexonen** gesprochen (Jiang und Goodenough, 1996; Abb. 1D). Ein Gap Junction-Kanal kann **homotypisch** sein, wenn er aus gleichartigen Connexonen aufgebaut ist, oder **heterotypisch**, wenn die zwei Connexone nicht identisch sind. Unabhängig von der Identität beteiligter Connexine wird eine Gap Junction-Kopplung zwischen gleichen Zelltypen als **homolog (homozellulär)**, zwischen verschiedenen Zelltypen als **heterolog (heterozellulär)** bezeichnet. Viele Connexine, z.B. Cx26 und Cx32 (Stauffer, 1995), sind in der Lage, heterotypische Kopplungen auszubilden (Swenson et al., 1989; Elfgang et al., 1995; Sosinsky, 1995; Cottrell und Burt, 2001). Dagegen bildet Cx31 nur homotypische Kanäle mit sich selbst (Elfgang et al., 1995). Ferner konnten heteromere Hemikanäle auch *in vivo* nachgewiesen werden, z.B. Cx26/Cx32 (Diez et al., 1999) und Cx46/Cx50 (Jiang und Goodenough, 1996). Hierdurch ergibt sich eine große Vielfalt an Möglichkeiten für die Zusammensetzung der Proteine eines Gap Junction-Kanals.

Eine zentrale Rolle in der Inter-Connexon-Erkennung spielen dabei die beiden konservativen extrazellulären Schleifen der Connexine (Bruzzone et al., 1996; Foote et al., 1998). Die Bildung von heterotypischen Kanälen ist ein selektiver Prozeß und folgt bestimmten Regeln der Kompatibilität zwischen Connexinen (White et al., 1994, 1995). Eine physiologische

Konsequenz nicht funktionsfähiger Gap Junction-Kanäle (nicht kompatibler Kanäle) ist die Abgrenzung von Geweben / Zellen und die Bildung von Kommunikationskompartimenten.

Der dynamische Prozeß der Formation von Gap Junctions wird zum einen durch die Beteiligung von extrazellulären Matrixmolekülen und zum anderen durch bestimmte Regionen der Connexin-Moleküle beeinflusst (Willecke et al., 2002). Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie und Zeitraffer-Darstellungen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Connexine zeigten, daß Gap Junction-Plaques äußerst mobile und dynamische Strukturen bilden (Falk, 2000; Gaietta et al., 2002; Lauf et al., 2002). Connexine weisen einen sehr schnellen *turnover* mit kurzen Halbwertszeiten von 2-5 Stunden in Zellkulturexperimenten auf (Evans und Martin, 2002).

Bis auf drei Ausnahmen (Cx32, Cx36 und Cx45) weisen alle Connexine eine einheitliche genomische Struktur auf. Ein Intron von variabler Länge trennt die 5'-untranslatierende Region, das Exon 1, von dem nicht unterbrochenen Leserahmen, codiert durch Exon 2 (Willecke et al., 2002).

1.1.2 Gewebespezifische Expression und Funktionsanalyse von Connexin-Genen

Connexine werden in zelltypspezifischen aber sich überschneidenden Mustern exprimiert. Häufig kommt es zur Expression von mindestens zwei verschiedenen Connexin-Genen (Willecke und Haubrich, 1996), z.B. in der Haut: Cx26, Cx30, Cx30.3 usw. (vgl. Tab. 1). Im Säuger-Nervensystem sind Cx26, Cx32 und Cx43 die Haupt-Isoformen (Dermietzel et al., 1989). Es gibt Connexine (z.B. Cx43), die in ihrer Gewebeverteilung sehr weit verbreitet sind, während Connexine wie Cx30.3, Cx31.1 und Cx33 ein sehr spezifisches Vorkommen zeigen (Bruzzone et al., 1996). Die Genexpression der Connexine kann sich während der Entwicklung verändern und unterschiedliche zeitliche Muster aufzeigen, wie z.B. während der Trophoblast-Differenzierung zur funktionellen Plazenta in Nagern (Reuss et al., 1996, 1997; Kidder und Winterhager, 2001) und Mensch (Winterhager et al., 1999, 2000), und während der Entwicklung des Gehirns (Dermietzel und Spray, 1993).

Durch gezielte Connexin-Gen-Inaktivierungen bei Mäusen und Generierung sogenannter „Connexin-Knockout-Mäusen“ konnte das Wissen um die Funktion vieler Gap Junction-Kanäle erheblich erweitert werden (Übersicht: Willecke et al., 2002). Der erste beschriebene gezielte Connexin-Defekt führte zu einer veränderten Herz-Morphologie und zum perinatalen Tod in Cx43-defizienten Mäusen (Reaume et al., 1995). Durch gezielte Ausschaltung des Cx26-Gens kam es zu einem Sterben der Embryonen *in utero* durch eine mangelnde Versorgung von Glukose über Cx26-Kanäle zwischen dem maternalen und embryonalen Blutkreislauf (Gabriel et al., 1998). Cx30-Knockout-Mäuse zeigten eine starke Beeinträchtigung des Hörvermögens (Teubner et al., 2003) und Mutationen im humanen Cx26-, Cx30- und Cx31-Gen führten zur erblichen, nicht syndromartigen Taubheit (Thönnissen et

al., 2002; Connexine/Taubheit-Internetseite: www.iro.es/deafness). Cx31-defiziente Mäuse wiesen eine transiente plazentare Fehlentwicklung auf (Plum et al., 2001). Ferner führten Inaktivierungsexperimente von Cx46, einem linsenspezifischen Connexin, bei Mäusen zur Entwicklung von Linsentrübungen (Katarakten) (Gong et al., 1997). Die entsprechende Mutation im humanen Genom führte zu dem gleichen Phänotyp (Mackay et al., 1999). Durch die Generierung von gewebespezifischen Knockout- und Doppel-Knockout-Mäusen wird in neuesten Analysen versucht, die Funktionen spezifischer Connexine aufzuklären. Plum et al. (2000) konnten in Knockin-Experimenten zeigen, daß Cx32 und Cx40 teilweise die Funktion von Cx43 ersetzen können. Dadurch wurde bestätigt, daß bestimmte Connexine neben spezifischen Eigenschaften auch Funktionen aufweisen, die sie mit anderen Connexinen teilen.

1.1.3 Physiologie der Gap Junction-Kanäle

Es ist bekannt, daß verschiedene Gap Junction-Kanäle unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften wie Leitfähigkeit, Ionenselektivität und Spannungsabhängigkeit besitzen (Veenstra und DeHaan, 1986; Valiunas et al., 2002). Heterotypische Kanäle zeigen im Vergleich zu homotypischen Kanälen andere, asymmetrische physiologische Eigenschaften (Barrio et al., 1991), und auch heteromere Connexone weisen spezifische physiologische Merkmale auf (Jiang und Goodenough, 1996). Der Öffnungszustand von Gap Junction-Kanälen kann durch nicht kovalente (z.B. elektrostatische Interaktionen) oder kovalente Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen am C-Terminus der Connexin-Proteine durch Proteinkinasen) verändert werden. Außerdem können die Kanäle sowohl durch verschiedene pharmakologische Agenzien als auch durch extra- und intrazelluläre Botenstoffe (Ca^{2+} , cAMP, IP_3) moduliert werden. Diese Modulationen sind gewebe- und connexinspezifisch (Bruzzone et al., 1996). Die Gap Junctions der meisten Systeme sind sensitiv gegenüber elektrischen Potentialdifferenzen. Sowohl eine intrazelluläre Azidifizierung als auch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zum Verschluß der Gap Junction-Kanäle. Ferner gibt es Unterschiede in der Permeabilität von Farbstoffmolekülen, wie z.B. Lucifer Yellow, unter den Connexin-Isoformen (Steinberg et al., 1994; Elfgang et al., 1995; Cao et al., 1998).

Zur Quantifizierung des Grades der interzellulären Kommunikation zwischen Zellen wurde routinemäßig nach Injektion von Gap Junction permeablen Farbstoffen, wie Lucifer Yellow (Stewart, 1978) und Neurobiotin (Vaney, 1991) in eine Zelle, die Anzahl an benachbarten Zellen bestimmt, in denen sich der Farbstoff ausbreitete (Safranyos et al., 1987; Elfgang et al., 1995; Cao et al., 1998). Jedoch wies diese Methode zahlreiche Nachteile auf, wie die unterschiedliche Permeabilität der Farbstoffe bei den einzelnen Connexin-Isoformen, das subjektive Auszählen gefärbter Zellen und die begrenzte Anzahl an ausgewerteten Zellen

pro Experiment. 1993 wurde daher eine neue Farbstoff-Beladungstechnik mit dem Farbstoff Calcein-AM in Kombination mit der fluoreszenzaktivierten Durchflußzytometrie (*fluorescence activated cell sorting*: FACS) eingeführt (Tomasetto et al., 1993). Dieser membranpermeable Farbstoff wird intrazellulär durch nicht spezifische Esterasen in impermeables fluoreszierendes Calcein umgewandelt, welches nur noch über die Gap Junction-Kanäle ausgetauscht werden kann. Die Quantifizierung der gekoppelten Zellen erfolgte über die FACS-Analyse (Kiang et al., 1994; Juul et al., 2000; Czyz et al., 2000; Rütz und Hülser, 2001). So wurde mit Hilfe dieser Methode die Auswertung einer großen Anzahl an Zellen in einem Experiment möglich.

Spezifischen Connexin-Domänen werden verschiedene funktionelle Fähigkeiten zugeordnet. Die größte Aufmerksamkeit in den Connexin-Studien liegt in den Regionen der zytoplasmatischen Schleife und des C-Terminus. Diese Bereiche der Connexin-Proteine sind deshalb besonders interessant, da sich die Aminosäure-Sequenzen dieser Domänen in den einzelnen Connexinen stark unterscheiden und daher dort deren funktionelle Unterschiede vermutet werden. Neben der Bedeutung der Cx-Kanäle für den Austausch von Signalmolekülen ist lange bekannt, daß der C-Terminus eine große Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion spielt (Bruzzone et al., 1996). Cx43 kann posttranslational über die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten am C-Terminus moduliert werden. Der C-Terminus ist u.a. der Ort von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen. Die C-terminale Region von Cx43 kann z.B. mit ZO-1 (Giepmans und Moolenaar, 1998; Toyofuku et al., 1998), α - und β -Tubulin (Giepmans et al., 2001a) und c-Src (Giepmans et al., 2001b; Toyofuku et al., 2001) interagieren. Die Sequenz des C-Terminus enthält mutmaßliche SH2-, SH3- und PDZ-Protein-Bindungsdomänen, die die Interaktion von Cx43 mit anderen Proteinen vermitteln (Evans und Martin, 2002).

Ferner weisen Connexine noch eine weitere Funktion auf. Es konnte gezeigt werden, daß der C-Terminus von Cx43 einen direkten Einfluß auf das Wachstumsverhalten von Neuro2a-Zellen und 3T3 A31 Fibroblasten hat (Moorby und Patel, 2001). Dies war der erste Beweis, daß Cx43 das Wachstum auch unabhängig von der Bildung von Gap Junction-Kanälen regulieren kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß ein weiteres Protein, NOV, mit dem C-Terminus zu interagieren scheint.

1.2 NOV, ein Wachstumsregulator der CCN-Familie

Ein Zusammenhang zwischen dem NOV-Gen und der Existenz von Gap Junctions wurde 2001 erstmals in C6-Gliomazellen nach Transfektion mit Cx43 beschrieben (McLeod et al., 2001; Gupta et al., 2001). Mit der *Differential Display*-Methode konnte eine Hochregulation von NOV in Cx43-transfizierten C6-Gliomazellen gefunden werden.

Die CCN-Familie der Wachstumsregulatoren besteht aus sechs Mitgliedern: CYR61 (*cysteine-rich protein 61*; CCN1), CTGF (*connective tissue growth factor*, CCN2), NOV (*nephroblastoma overexpressed*; CCN3) und WISP1-3 (*Wnt-1-induced secreted proteins*; CCN4-6) (Übersicht: Perbal, 2001; Abb. 2). Der Name **CCN** entstammt den ersten Buchstaben der zuerst entdeckten Proteine **C**YR61, **C**TGF und **N**OV. Die Proteine dieser Familie sind sekretorische, mit der extrazellulären Matrix assoziierte Proteine. Sie weisen vielfältige Funktionen auf und spielen eine Rolle in der Proliferation, Migration, Differenzierung, Adhäsion, Wundheilung, Angiogenese und Tumorgenese. Im strukturellen Aufbau ähneln sich die einzelnen Mitglieder sehr. Sie weisen alle eine Konservierung in 38 Cysteinen und ein N-terminales (NT) Sekretionssignal auf. Ferner sind sie aus vier strukturellen Baueinheiten, die alle von getrennten Exons codiert werden, aufgebaut: eine IGFBP ähnliche Domäne (IGFBP: *insulin-like growth factor binding protein*), eine Von Willebrand-Faktor ähnliche Domäne (VWC: *Von Willebrand factor type C repeat*), eine Thrombospondin ähnliche Domäne (TSP-1: *thrombospondin type 1 repeat*) und eine CT-Domäne (C-terminale Domäne, *cystein knot containing family of growth regulators* ähnliche Domäne).

Struktur und Funktion von NOV

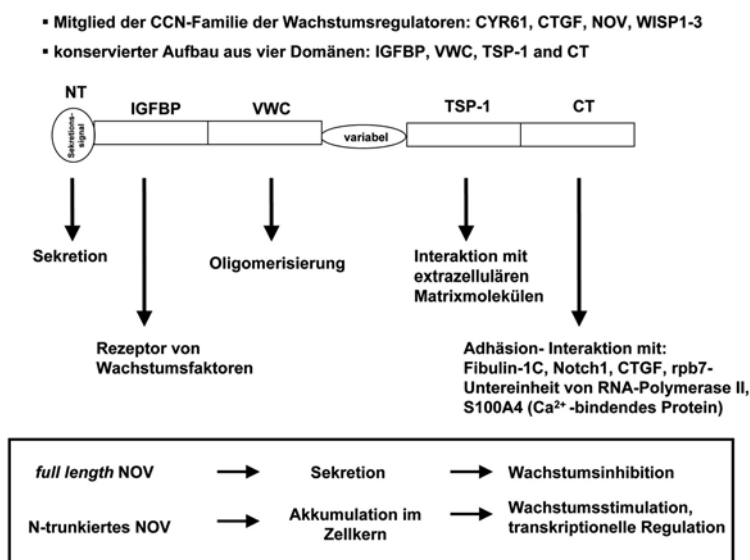


Abb. 2: Struktur und Funktion von NOV. NT: N-terminale Region mit Sekretionssignal, IGFBP: *insulin-like growth factor binding protein* ähnliche Domäne, VWC: *Von Willebrand factor type C repeat* ähnliche Domäne, TSP-1: *thrombospondin type 1 repeat* ähnliche Domäne, CT: C-terminale Domäne, *cystein knot containing family of growth regulators* ähnliche Domäne. Näheres siehe Text (zusammengestellt aus Perbal, 1999, 2001).

NOV wurde 1992 als ein aberrant exprimiertes Gen im Huhn-Nephroblastom identifiziert, welches durch das *myeloblastosis* assoziierte Virus (MAV: *myeloblastosis associated virus*) induziert wurde (Joliot et al., 1992). Es wurde als eine Integrationsstelle für den MAV-Retrovirus im Affen-Nephroblastom (Modell des Wilm's Tumors bei Kindern) entdeckt. NOV ist ein 32 kDa großes Protein (44-48 kDa in der Zellkultur), welches glykosyliert werden kann und in die extrazelluläre Matrix sekretiert wird oder an der Zellmembran verbleibt. Eine N-Terminus trunkierte Form mit 31/32 kDa wurde in den Zellkernen von HeLa- und

Osteosarkomzellen und im konditionierten Medium von Zellen, die NOV exprimieren, beschrieben (Perbal, 1999; Maillard et al., 2001).

Das humane NOV-Protein wird in zahlreichen Geweben exprimiert wie z.B. in Niere, Nervensystem, Lunge, Herz, Leber, Milz, Thymus, Endothel, Muskel und Knorpel (Perbal, 2001). Die Expression von NOV ist in vielen Geweben während der Entwicklung zeitlich reguliert. Während NOV z.B. im Huhn-Herzgewebe nur im Embryonalstadium und in der Lunge nur im adulten Gewebe gefunden wurde, konnte NOV im Nervensystem in beiden Stadien nachgewiesen werden (Joliot et al., 1992). In vielen verschiedenen Typen von Tumoren konnte eine veränderte Expression von NOV detektiert werden. NOV ist in mesenchymalen Tumoren überexprimiert (Perbal, 2001). Im Neuroblastom, Wilm's Tumor, Osteosarkom und Chondroblastom ist die Expression von NOV ein Differenzierungsmarker, während im Nierenkarzinom, Prostatakarzinom und in Ewing's Tumoren die Expression von NOV mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert ist (Perbal, 2001; Li et al., 2002).

Während die CCN-Proteine CYR61 und CTGF positive Regulatoren des Zellwachstums sind, zeigt NOV auch negative regulatorische Fähigkeiten und ist das erste Beispiel für eine veränderte Expression in Assoziation mit der Entwicklung von Tumoren. NOV ist primär in ruhenden Zellen nachzuweisen und wird bei Induktion der Proliferation durch Serum herunterreguliert. Auch in embryonalen Fibroblasten des Huhns konnte eine Wachstumsinhibition durch die Expression von NOV beobachtet werden (Joliot et al., 1992; Scholz et al., 1996). Im Nieren- und Prostatakarzinom ist NOV mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert, während im Glioblastom eine antiproliferative Aktivität von NOV nachgewiesen wurde (Glukhova et al., 2001; Maillard et al., 2001; Gupta et al., 2001). Die biologischen Eigenschaften von NOV hängen von dessen Struktur, subzellulärer Lokalisation und vom Zelltyp ab (Perbal, 2001).

Die N-trunkierte Form des NOV-Proteins im Zellkern führt zur Wachstumsstimulation, während das *full length* Protein das Wachstum inhibiert (Abb. 2).

Mit Hilfe des *Two-Hybrid*-Systems konnten Interaktionen von NOV mit anderen Proteinen nachgewiesen werden (siehe Abb. 2). Z.B. bindet NOV das extrazelluläre Matrix-Protein Fibulin-1c, welches an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt ist (Perbal et al., 1999). Desweiteren konnte eine Assoziation zwischen NOV und rpb7, einer Untereinheit der RNA-Polymerase II, gezeigt werden (Perbal, 1999). Diese Interaktion deutet auf eine Regulation der Transkription im Zellkern hin. Kürzlich konnte beobachtet werden, daß NOV auch mit der *EGF-like repeat*-Region (EGF: *epidermal growth factor*) von Notch1, einem transmembranen Rezeptorprotein, über den C-Terminus interagiert (Sakamoto et al., 2002). Der Notch-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Zelldifferenzierung vieler Zellen (Allenspach et al., 2002). In neusten Untersuchungen wurde eine Beteiligung von NOV im Kalzium-Signalweg beschrieben (Li et al., 2002). Es wurde eine starke Expression

von NOV in Geweben detektiert, in denen Ca^{2+} ein wichtiger Regulator ist, wie in der Nebenniere, ZNS, Knochen, Knorpel, Herzmuskel und Niere. NOV zeigte eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Zellen des Nervensystems und im Glioblastom. Es konnte das Ca^{2+} -bindende Protein S100A4 (mts1) als ein weiterer Interaktionspartner von NOV identifiziert werden (Li et al., 2002).

1.3 Gap Junctions und Trophoblast

Alle Säugetiere entwickeln während der Embryonalentwicklung als erstes Organ die Plazenta, die den mütterlichen Organismus mit dem Fötus verbindet und den Stoffaustausch zwischen dem mütterlichen und embryonalen Kreislauf ermöglicht. Beim Menschen ist die Entwicklung der Plazenta durch eine Invasion des Trophoblasten in das Endometrium gekennzeichnet, die einen direkten Kontakt zwischen Trophoblast und mütterlichem Blut herstellt. Dabei kommt es zur Arrosion maternaler Gefäße und zur Ausbildung einer hämochorialen Plazenta (Benirschke und Kaufmann, 2000).

Der Vorgang der Trophoblast-Invasion in das maternale Gewebe während der Implantation und Plazentation unterliegt, verglichen mit dem unkontrollierten Invasionsverhalten von Tumorzellen, einer strengen räumlichen und zeitlichen Regulation (Yagel et al., 1988, 1989; Strickland und Richards, 1992; Lala et al., 2002). Die Trophoblastzellen durchlaufen während der Implantation verschiedene Differenzierungsstufen, die in der Ausbildung von Trophoblast-Populationen mit verschiedenen Funktionen resultieren (Benirschke und Kaufmann, 2000). Die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen sind Gegenstand aktueller Forschung. In der Maus konnten durch gezielte Mutationen verschiedene Fehlentwicklungen der Plazenta beobachtet werden, die zum Tod des Embryos *in utero* führten (Übersicht: Cross et al., 1994; Copp, 1995; Cross, 2000; Rossant und Cross, 2001). Mit dem Einsatz von Gene-Arrays wird derzeit versucht, das Genexpressionsmuster, das bei der humanen Trophoblast-Differenzierung eine Rolle spielt, aufzuklären (Aronow et al., 2001; Chen et al., 2002). Studien zeigten, daß dabei zahlreiche Faktoren, wie u.a. Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Matrix-Metalloproteasen (MMP's), Integrine, Cadherine und Sauerstoffkonzentration eine Rolle spielen (Übersicht: Cross et al., 1994; Cronier et al., 2001).

Zum Zeitpunkt der Implantation während der humanen Plazentaentwicklung hat sich die befruchtete Eizelle bereits in Embryoblast und Trophoblast differenziert. Während sich aus dem Embryoblast der Embryo und die Nabelschnur entwickeln, heftet sich der Trophoblast an das Uterusepithel an und penetriert in das Endometrium. Trophoblastzellen sind während der Invasion in die Dezidua fähig die Endothelzellen der maternalen Blutgefäße (Spiralarterien) zu ersetzen und ein Mosaik mit den Endothelzellen zu etablieren (Zhou et al., 1997). Dabei verändern sie ihr zellbiologisches Programm und nehmen einen vaskulären

Phänotyp an, wie die Expression von VE-Cadherin, PECAM-1, VCAM-1 und α_4 -Integrine zeigte. Ebenfalls kommt es zu einer morphologischen Umgestaltung der Gefäßwand der Spiralarterien, derart, daß die Media degeneriert und sich deswegen die Gefäße nicht mehr kontrahieren können. Dies führt zu einer permanenten Blutzufuhr in den intervillösen Raum. Unmittelbar nach der Implantation findet eine Differenzierung des Trophoblasten in Zyto- und Synzytiotrophoblast statt (Benirschke und Kaufmann, 2000). Der villöse Trophoblast besteht aus dem Synzytiotrophoblasten und dem darunterliegenden Zytotrophoblasten (Abb. 3A). Er dient dem fetomaternalen Stoffaustausch. Die invadierenden Trophoblastzapfen werden als Primärzotten bezeichnet. Im Synzytiotrophoblasten finden keine Kernteilungen mehr statt. Eine Regeneration erfolgt nur durch eine synzytiale Verschmelzung des Zytotrophoblasten. Die Zytotrophoblastzellen differenzieren sich in villöse und invasive extravillöse Zellpopulationen (Ohlsson, 1989). Es existieren zwei Differenzierungswege in der humanen Plazenta, der Fusions-Phänotyp (villöser Trophoblast) und der proliferative / invasive Phänotyp (extravillöser Trophoblast) (Abb. 3B). Zum extravillösen Trophoblasten gehören die Zellinseln und Zellsäulen, die stark proliferative Eigenschaften aufweisen (Stammzellen; Abb. 3). Zellinseln, die ausschließlich aus Zytotrophoblast bestehen, treten an der Chorionplatte, an den Stammzottenabgängen von der Chorionplatte und an den Stammzotten in der Nähe der Basalplatte auf. Als Zellsäulen werden die Regionen bezeichnet, die als Haftzotten mit dem maternalen Gewebe, der Dezidua, in Kontakt treten.

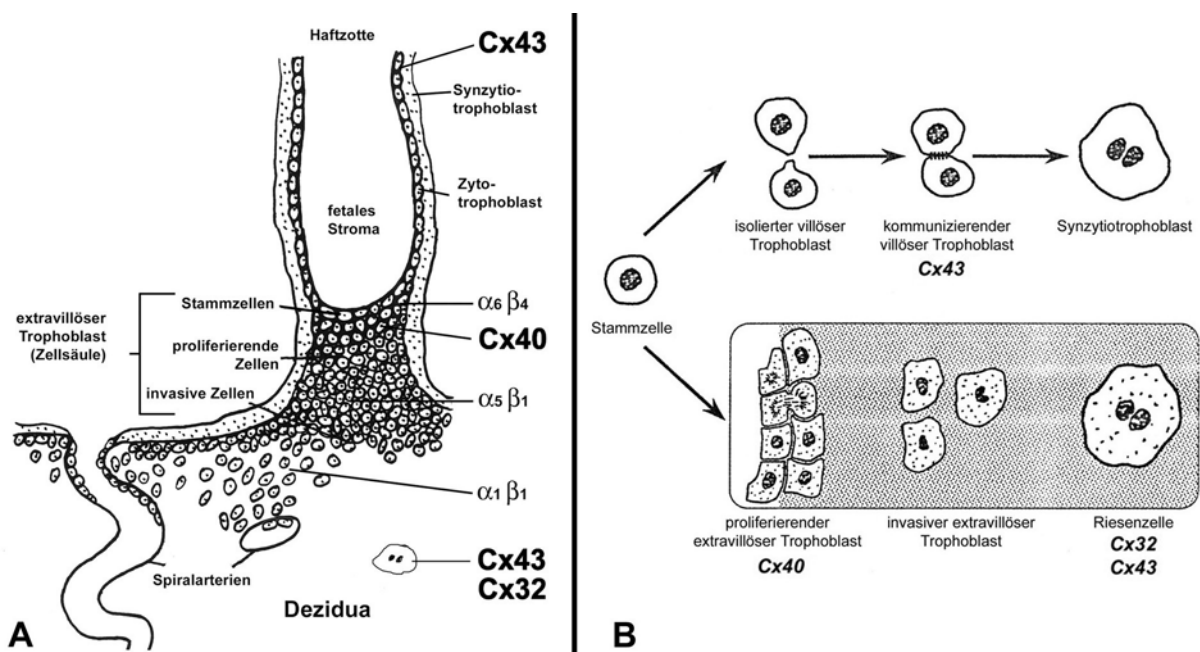


Abb. 3: (A) Schematischer Ausschnitt einer Haftzotte der frühen humanen Plazenta. Invasion der Trophoblastzellen in die Dezidua und Migration in die Spiralarterien. Darstellung der Connexin- und Integrin-Expression. **(B) Schematische Darstellung der zwei Wege der Zytotrophoblast-Differenzierung mit entsprechender Connexin-Expression.** Näheres siehe Text (modifiziert nach Cronier et al., 2001).

Mit Hilfe der Gefrierbruch-Technik konnten Gap Junction-Plaques zwischen Synzytio- und Zytotrophoblastzellen in frühen Plazenten (de Virgiliis et al., 1982), aber nicht zwischen Trophoblastzellen in reifen Plazenten, nachgewiesen werden (Metz et al., 1979; Metz und Weihe, 1980).

Spätere Untersuchungen konnten zeigen, daß die proliferativen extravillösen Trophoblastzellen der Zellinseln und -säulen durch die Expression von Cx40 charakterisiert sind (Abb. 3; Winterhager et al., 1999). Dieses Connexin wird supprimiert, wenn sich die Trophoblastzellen der Zellsäulen vom Gewebeverband ablösen und in die Dezidua einwandern. Ebenso kommt es zu einem Wechsel in der Integrin-Expression von $\alpha_6\beta_4$ - über $\alpha_5\beta_1$ - zu $\alpha_1\beta_1$ -Integrin (Damsky et al., 1992, 1994; Fisher und Damsky, 1993). Nach erneuter Zellaggregation in der Dezidua kommt es wieder zu einer Cx40-Reexpression. Die Cx40-Expression nimmt während fortschreitender Gravidität ab. Isolierte Trophoblastzellen dagegen zeigten zu der Cx40- auch eine Cx43-Expression (Winterhager et al., 1999).

Cronier et al. (1994a, 1997, 2001, 2002) konnten die Existenz von Cx43-mRNA und -Protein im villösen Trophoblasten zwischen Zytotrophoblastzellen und zwischen Zyto- und Synzytiotrophoblastzellen in isolierten und kultivierten Zellen bestätigen, sowohl in der frühen als auch in der reifen Plazenta (Abb. 3). Auch eine funktionelle intertrophoblastische Gap Junction-Kopplung konnte jüngst mit Hilfe der FRAP-Methode (FRAP: *fluorescence recovery after photobleaching*) nachgewiesen werden (Cronier et al., 2001, 2002). Cx43 ist dabei im Fusionsprozeß zum villösen Synzytiotrophoblasten involviert (Abb. 3B). Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions scheint hierbei eine Grundvoraussetzung für die Bildung des Synzytiotrophoblasten zu sein. Dagegen konnte nach Kultivierung von Zytotrophoblastzellen auf Matrigel nach zwei Tagen eine Expression von Cx40 beobachtet werden, die aber in diesem induzierten extravillösen Phänotyp nicht zu einer funktionellen Gap Junction-Kopplung führte (Cronier et al., 2002). Cx43 und Cx32 konnten ebenfalls in Riesenzellen (*giant cells*) entlang der invasiven extravillösen Trophoblast-Differenzierung detektiert werden (Al-Lamki et al., 1999; Cronier et al., 1999, 2001; Abb. 3).

Die gezielte Ausbildung verschiedener Connexine während der Trophoblast-Differenzierung wurde auch in anderen Spezies nachgewiesen. Während der Implantation bei der Ratte kommt es zur Bildung von zwei Kommunikationskompartimenten (Winterhager et al., 1991, 1993; Reuss et al., 1996, 1997). Die invasiven Trophoblastzellen des Ektoplazentarkonus (Plazenta-Anlage) exprimieren Cx31, während der aus der inneren Zellmasse hervorgehende Embryo eine Cx43-Expression aufweist. Mit dem Übergang von der invasiven Phase des Trophoblasten zur differenzierten Plazenta nimmt die Expression von Cx31 ab. Cx31-Knockout-Mäuse wiesen eine gestörte Balance zwischen Proliferation und Differenzierung zugunsten der Differenzierung auf. Diese führte zu der schon beschriebenen Fehlentwicklung der Plazenta (Plum et al., 2001). Die Rolle der Cx31-Expression für das

Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Trophoblastzellen wird derzeit an Maus-Trophoblaststammzellen, denen das Cx31-Gen fehlt, untersucht.

1.4 Die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3, ein Modell für den humanen proliferativen Trophoblasten

Da experimentelle Untersuchungen mit der Verwendung von humanen Blastozysten zur Aufklärung der Mechanismen der Implantation beim Menschen aus ethischen Gründen nicht möglich und humane Trophoblaststammzellen noch nicht etabliert sind, wurden permanent wachsende humane Trophoblastzelllinien für *in vitro*-Experimente etabliert. Als Modell für den Trophoblasten der frühen, unreifen Plazenta wurden daher humane Chorionkarzinomzellen eingesetzt (Grümmer, 1991). Hierbei handelt es sich um die maligne Variante des Trophoblasten (Bagshawe, 1969; Szulman und Buchsbaum, 1987), die neben den typischen Eigenschaften von Tumorzellen noch zahlreiche Charakteristika von normalen Trophoblastzellen zeigt (Pattillo et al., 1968; Takamizawa und Sekiya, 1984). Sowohl Chorionkarzinomzellen als auch Trophoblastzellen weisen viele proteolytische Enzyme wie Urokinase, Kollagenase Typ IV und Matrix-Metalloproteasen (MMP's) auf, um die Basalmembran zu durchdringen und durch die extrazelluläre Matrix zu migrieren (Strickland und Richards, 1992). Desweiteren sind die Chorionkarzinomzellen wie Trophoblastzellen zur Synthese von Plazentahormonen wie Östradiol, Progesteron und hCG (humanes Choriongonadotropin) befähigt (Pattillo et al., 1968) und können zu Synzytiotrophoblast ähnlichen Zellen fusionieren (Burres und Cass, 1986). Chorionkarzinomzelllinien sind durch eine inhomogene, morphologische Variabilität ihrer Zellpopulationen gekennzeichnet. Es konnten Zellen mit morphologischen Merkmalen des Zyto- sowie des Synzytiotrophoblasten beobachtet werden (Kurman et al., 1984). Chorionkarzinomzellen können ebenso wie die benignen Trophoblastzellen in die Wirtsgefäße einwandern und die Endothelien ersetzen (Zhou et al., 1997; Grümmer et al., 1999). Daher sind Chorionkarzinomzellen auch ein geeignetes Modell zur Untersuchung der zellbiologischen Mechanismen, die zu dieser Endothelzell-Mimikry führen.

Der große Unterschied zwischen Trophoblast- und Chorionkarzinomzellen liegt jedoch in der kontrollierten Invasivität des benignen Trophoblasten *in vivo*. Maligne Trophoblastzellen werden intensiv untersucht, um die Mechanismen aufzuklären, die die kontrollierte Proliferation im benignen Trophoblasten vom unkontrollierten Zellwachstum im Chorionkarzinom unterscheiden. Außerdem wurden anhand dieser *in vitro*-Modelle die invasiven Eigenschaften der Trophoblastzellen untersucht (Grümmer et al., 1994).

Das Chorionkarzinom ist ein von dem Zyto- und Synzytiotrophoblasten der Plazenta ausgehender Tumor. Dieser Tumor ist durch eine Lakunenbildung und eine starke hämatogene Metastasierung gekennzeichnet (Takamizawa und Sekiya, 1984). Die

hämatogene Metastasierung erfolgt beim Menschen vor allem in die Lunge, kann aber auch in ZNS, Leber, Gastrointestinal- und Harntrakt gefunden werden (Ober et al., 1971).

Es wurden drei Chorionkarzinomzelllinien (BeWo, Jeg3 und JAr) auf ihr Connexin-Expressionsmuster hin untersucht (Hellmann et al., 1996). Während Jeg3-Zellen nur eine sehr geringe Menge an Cx40-mRNA aufwiesen und daher als kopplungsdefizient beschrieben wurden, zeigten die BeWo- und JAr-Zellen auch eine Cx40-Expression auf der Protein-Ebene. Unter Verwendung von endometrialem Gewebe als Wirtsgewebe zeigten die Jeg3-Zellen in einem *in vitro*-Modell den stärksten invasiven Phänotyp (Grümmer et al., 1994). Die Gründe für diese starke hämatogene Metastasierung sind Gegenstand aktueller Forschung.

1.5 Gap Junctions und Tumorgenese

Das Fehlen von Gap Junction-Kanälen ist oft mit einer reduzierten Proliferationskontrolle und Tumorgenese assoziiert (Yamasaki, 1991; Yamasaki und Naus, 1996; Yamasaki et al., 1999). Darüber hinaus kann auch eine nicht gewebespezifische Expression und eine veränderte Lokalisation von Connexinen zu einer Dedifferenzierung und somit einer Tumorprogression führen (Krutovskikh et al., 1994, 2000; Yamasaki et al., 1995).

Yamasaki (1991) stellte ein Modell vor, wie die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions eine Rolle für die Tumorgenese spielen könnte: Die Tumorzellen zeigen dabei entweder einen völligen Verlust der Kommunikation über Gap Junctions oder sie bilden andere Connexin-Kanäle als das umliegende Gewebe (Abb. 4). In beiden Fällen verlieren die Tumorzellen ihre Kommunikation mit der Umgebung und lösen sich aus dem Gewebeverband. Dadurch entziehen sie sich einer Proliferationskontrolle.

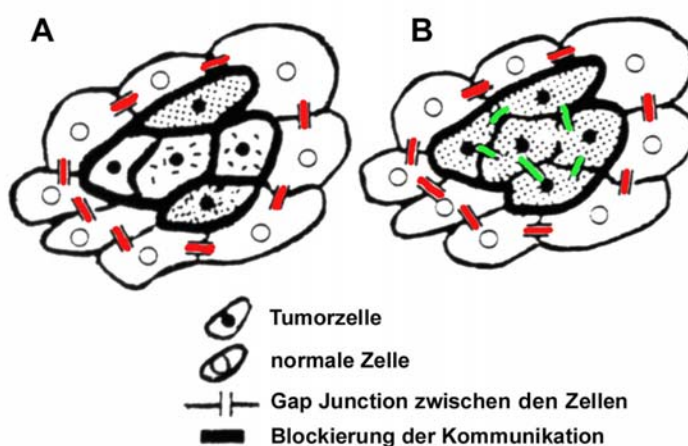


Abb. 4: Modell der Rolle der Gap Junctions bei der Tumorbildung. Durch den Verlust der Gap Junction-Kommunikation der Tumorzellen untereinander (A) oder mit dem umliegenden Gewebe (B) durch die Expression eines anderen Gap Junction-Kanals (grün) als die umliegenden normalen Zellen (rot) entziehen sich die Tumorzellen einer Wachstumskontrolle (aus Yamasaki, 1991).

Schon 1966 wurde von Loewenstein und Kanno beschrieben, daß Lebertumorzellen keine zelluläre Kommunikation aufweisen. Analysen weiterer Tumore bestätigten den Verlust der homozellulären Kommunikation über Gap Junctions (Wilgenbus et al., 1992; Krutovskikh et

al., 1994). Cx32-defiziente Mäuse bildeten deutlich mehr spontane und durch das Karzinogen Diethylnitrosamin induzierte Leberkarzinome (Temme et al., 1997; Evert et al., 2002). Ein Verlust der heterozellulären Kommunikation der Tumorzellen mit dem umliegenden Gewebe bei nicht eingeschränkter homozellulärer Kommunikation wurde zuerst an murinen embryonalen BALB/c3T3-Zellen beschrieben (Enomoto und Yamasaki, 1984). Die chemisch transformierten BALB/c3T3-Zellen zeigten zwar eine Kopplung untereinander, jedoch nicht mit nicht transformierten Zellen. Als mögliche Ursachen konnten eine Veränderung der Connexin-Expression und die Bildung inkompatibler Connexone aufgezeigt werden (Krutovskikh et al., 1994).

Umgekehrt wurde in zahlreichen Untersuchungen gezeigt, daß die Transfektion von Connexin-Genen in Tumorzellen, die keine oder nur eine geringe Gap Junction-Kopplung aufweisen, das normale Zellwachstum sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wiederherstellt (Übersicht: Yamasaki et al., 1999). Daher wurde den Connexinen auch eine tumor-suppressive Funktion zugesprochen. Diese Funktion der Connexine ist connexin- und gewebespezifisch und abhängig vom Grad der interzellulären Kopplung (Hellmann et al., 1999; Yamasaki et al., 1999). Eine Transfektion mit Cx43 bei transformierten Maus-10T1/2-Zellen und mit Cx43 oder Cx30 bei C6-Rattengliomazellen führte zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation *in vitro* (Mehta et al., 1991; Zhu et al., 1991a, 1992; Princen et al., 2001). Ebenso konnten in Cx43-transfizierten Ovarialkarzinomzellen (Fernstrom et al., 2002) und in Cx26-transfizierten Leberkarzinomzellen (Muramatsu et al., 2002) ein reduziertes Zellwachstum *in vitro* und Tumorwachstum *in vivo* nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Analyse von Brustdrüsenkarzinomzellen beobachtet werden (Hirschi et al., 1996; Saunders et al., 2001). Dagegen führte eine Transfektion von Cx32 bei humanen Lebertumorzellen nur zu einer Reduktion der Tumorbildung in Nacktmäusen (Eghbali et al., 1993).

Zudem ist durch zahlreiche Untersuchungen bekannt, daß chemotherapeutische Agenzien, wie Carotinoide und Retinoide, die Connexin-Expression erhöhen und die Tumorgenese *in vitro* inhibieren (Hossain et al., 1993; Ara et al., 2002). Dagegen führten viele Tumor induzierende Agenzien wie Phorbol ester zu einer Inhibition der Kommunikation über Gap Junctions (Trosko et al., 1990). Jedoch gibt es auch widersprüchliche Ergebnisse zur Tumorsuppressor-Funktion von Connexinen. Im Brustkarzinom wurde sowohl eine verstärkte Expression (Jamieson et al., 1998) als auch eine reduzierte Expression von Connexinen beschrieben (Wilgenbus et al., 1992). Hotz-Wagenblatt und Shalloway (1993) konnten in einigen Tumorzellen keine Reduktion der Gap Junction-Kommunikation feststellen. Daher scheint ein Verlust oder Reduktion der Kommunikation über Gap Junctions nicht generell für jeden Tumortyp zu zutreffen.

Die molekularen Mechanismen, die zu einem Verlust der Gap Junction-Kopplung führen könnten, sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Eine wichtige Rolle bei der Herunterregulation der Connexin-Expression in einigen Tumoren scheint zum einen die Hypermethylierung der Promotoren zu sein, zum anderen wurden Connexin-Mutationen in einigen Tumoren gefunden (Yamasaki et al., 1999). Es konnten Mutationen von Cx37 in endothelialen Tumoren beim Nager nachgewiesen werden (Saito et al., 1997). Kürzlich konnten zahlreiche Mutationen im C-Terminus des Cx43-Gens, nicht dagegen im Cx32-Gen, beim humanen Dickdarm-Karzinom beschrieben werden (Dubina et al., 2002). Da die Expression des mutierten Cx43-Proteins auf die invasiven Strukturen der Tumore beschränkt ist, wurde auf eine Beteiligung des mutierten Cx43 an der Progression des Darmkrebses in Richtung Malignität geschlossen.

1.6 Gap Junctions und Invasion

Die Rolle der Gap Junctions im Prozeß der Metastasierung, d.h. die Loslösung der Tumorzellen vom Primärtumor, die Durchdringung der Basalmembran, die Migration durch die extrazelluläre Matrix und die Invasion in die Blut- und Lymphgefäße mit nachfolgender Extravasation, ist Gegenstand intensiver Studien (Weiss et al., 1989; Pauli et al., 1990; Ito et al., 2000; Carystinos et al., 2001). Durch Erkennung spezifischer Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Endothelzellen sind einige Tumorzellen in der Lage, Sekundärorgane selektiv zu besiedeln (Zhu et al., 1991b). Es gibt vermehrt Hinweise, daß eine heterologe Kommunikation zwischen den Tumorzellen und den Zellen des Wirtsgewebes eine große Rolle beim Invasions- und Extravasationsvorgang spielt. So konnten Bräuner und Hülser (1990) in einem *in vitro*-Invasionsassay (Mareel et al., 1979) nachweisen, daß eine solche heterologe Kommunikation von verschiedenen Tumorzellen mit kultivierten Hühnerherzfragmenten eine Voraussetzung für eine Invasion in das Wirtsgewebe sein kann. Die Zelllinie BICR konnte mit dem kultivierten Herzgewebe Gap Junctions ausbilden und zeigte somit auch eine schnelle und tiefe Invasion. Dagegen konnte nachgewiesen werden, daß HeLa-Zellen ohne heterologe Kommunikationsmöglichkeit mit den Herzzellen nicht invasiv waren. Durch Cx43-Transfektion von malignen Gliomazellen wurde die Adhäsion und die Invasion dieser Tumorzellen durch die Ausbildung funktioneller Cx43-Kanäle mit Astrozyten erhöht (Lin et al., 2002). Tumorzellen sind, wie bereits beschrieben, in der Lage, Mosaikgefäße mit Endothelzellen aufzubauen und diese zu ersetzen, um die Invasion zu erleichtern (Maniotis et al., 1999; McDonald et al., 2000; Folkman, 2001). Dieses vaskuläre Mimikry scheint eine Grundvoraussetzung für das weitere Fortschreiten der Tumorgenese zu sein. Es ist bekannt, daß Tumorzellen beim Prozeß der Extravasation zunächst an das Endothel adhärieren müssen (El-Sabban und Pauli, 1991, 1994-1995; Ito et al., 2000). Die Endothelzellen lösen ihre interzellulären Membrankontakte und ermöglichen dadurch den Tumorzellen, in das

Stroma zu penetrieren. Der dabei ablaufende zellbiologische Mechanismus ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Auch El-Sabban und Pauli (1991) korrelierten das Invasionsverhalten von verschiedenen Melanom- und Adenokarzinomzelllinien in Endothelzell-Monolayern mit der Fähigkeit zur heterologen Kommunikation. Jedoch gibt es in dieser Thematik durchaus widersprüchliche Versuchsergebnisse. Eine erhöhte Cx43-Expression in Plattenepithelkarzinomen reduzierte das Invasionspotential durch das Endothel (Shibata et al., 2000). Da die heterologe Kommunikation zwischen Tumorzellen und dem umliegenden Gewebe, wie z.B. Endothelzellen, eine wichtige Rolle für die Invasion und Extravasation spielt, sind weitere Untersuchungen zur Aufklärung der dabei ablaufenden Prozesse notwendig.

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluß verschiedener Gap Junction-Kanäle auf das Proliferations-, Differenzierungs- und Invasionsverhalten des Trophoblasten analysiert werden. Im Fokus dieser Arbeit war die Untersuchung des Cx43- und Cx40-Kanals, da diese beiden Kanäle eine spezielle Rolle bei der Trophoblast-Differenzierung spielen (Cronier et al., 1994a; Winterhager et al., 1999).

Als Modell des frühen proliferativen Trophoblasten wurde die humane Chorionkarzinom-zelllinie Jeg3, eine maligne Variante des Trophoblasten, verwendet. Diese Zelllinie weist neben den tumorspezifischen Eigenschaften noch zahlreiche Merkmale von normalen Trophoblastzellen auf. Die Jeg3-Zellen sind kommunikationsdefizient und eignen sich daher, um die Rolle verschiedener Cx-Gene für die Kontrolle der Proliferation und Differenzierung zu untersuchen (Hellmann et al., 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, stabile Jeg3-Connexin-Transfektanten (Cx43, Cx40, Cx26 und trunkiertes Cx43 (trCx43: Cx43 ohne große Bereiche des C-Terminus)) mit einer induzierbaren Genexpression über das Tetrazyklin-System (Tet-System) zu generieren. Das trunkierte Cx43-Konstrukt wurde eingesetzt, um den Einfluß des C-Terminus auf das Verhalten der Jeg3-Zellen zu untersuchen. Als zweites System sollten Connexin-Transfektanten mit dem zellspezifischen α hCG-Promotor hergestellt werden. Zunächst stand dabei die Charakterisierung der etablierten Zelltransfektanten hinsichtlich der Connexin-Expression im Vordergrund. Zusätzlich zu der Überprüfung der Connexin-mRNA- und -Protein-Expression sollte der funktionelle Kopplungsgrad der Transfektanten mittels der FACS-Analyse des Calcein-Transfers quantifiziert werden.

Mit diesen etablierten und charakterisierten Jeg3-Cx-Transfektanten sollte folgende Fragestellung bearbeitet werden:

- Welche Rolle spielt die Connexin-Expression für das Invasions- und Differenzierungsverhalten der Jeg3-Transfektanten?

Hierzu sollte zum einen die heterologe Kopplungsfähigkeit der Jeg3-Cx-Transfektanten mit der Maus-Endothelzelllinie bEnd3 *in vitro* analysiert werden. Zum anderen sollte nach subkutanem Wachstum der Jeg3-Transfektanten *in vivo* in der Nacktmaus das Invasions- und Differenzierungsverhalten der Tumorzellen morphologisch und immunhistochemisch untersucht werden. Unterschiede in der Differenzierung wurden anhand der Produktion von β hCG in *in vitro*-Analysen aufgeklärt.

- Welchen Einfluß haben die verschiedenen Connexine auf das Proliferationsverhalten der Jeg3-Transfektanten *in vitro* und auf das Tumorwachstum *in vivo*?

Dazu sollten sowohl Proliferationsstudien der Cx-Transfektanten *in vitro* als auch Wachstumsanalysen in der Nacktmaus durchgeführt werden.

- Welche Gene stehen mit der Cx-vermittelten Signalkaskade, die zu einem möglicherweise veränderten Wachstums- und / oder Invasionsverhalten der Jeg3-Transfektanten führt, in Zusammenhang?

Hierzu sollten Genexpressionsanalysen der Jeg3-Cx-Transfektanten und entsprechender Kontrollen mittels Gene-Arrays und semiquantitativer RT-PCR durchgeführt werden. Identifizierte Kandidatengene sollten daraufhin weiter untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Neben den gebräuchlichen Laborchemikalien wurden verwendet:

Agarose	PeqLab (Erlangen)
Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche (Boehringer; Mannheim)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Calcein-AM	MoBiTec (Göttingen)
α - ³² P-dCTP	ICN (Eschwege)
DAB Liquid Substrate-Chromogen-System	DAKO (Hamburg)
Dextransulfat	Serva (Heidelberg)
Dibutyl-cAMP (db-cAMP)	Sigma (Taufkirchen)
Dil	MoBiTec (Göttingen)
DMEM	Gibco BRL (Karlsruhe)
DMSO	Merck (Darmstadt)
100 bp DNA-Leiter	GeneCraft (Münster)
1 kb DNA-Leiter	GeneCraft (Münster)
DNase I	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP-Mix	Gibco BRL (Karlsruhe)
Doxyzyklin-Hydrochlorid	Sigma (Taufkirchen)
DTT	Gibco BRL (Karlsruhe)
Formamid, deionisiert	Sigma (Taufkirchen)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden)
FCS	Gibco BRL (Karlsruhe)
Geneticin (G418-Sulfat)	ICN (Eschwege)
Heringssperma-DNA (DNA MB grade)	Roche (Boehringer; Mannheim)
Hybond-N	Amersham Biosciences (Freiburg)
isotone NaCl-Lösung (0,9%)	Braun (Melsungen)
IPTG	Sigma (Taufkirchen)
Klenow-Enzym	Roche (Boehringer; Mannheim)
L-Glutamin	Gibco BRL (Karlsruhe)
LipofectAmine	Gibco BRL (Karlsruhe)
Luziferase-Assay-Kit	TROPIX, PE Biosystems
Lysozym	Sigma (Taufkirchen)
MEM	Gibco BRL (Karlsruhe)
M-MLV Reverse Transkriptase + Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Molekularsieb aus Polyamid (Ø 150 µm)	neoLab (Heidelberg)
MOPS	Serva (Heidelberg)
Multiprime DNA Labelling Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	MWG Biotech (Ebersberg)
One Shot-Kit (Top10F')	Invitrogen (Karlsruhe)
OptiMEM	Gibco BRL (Karlsruhe)
PBS Dulbecco	Seromed (Berlin)
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	Gibco BRL (Karlsruhe)
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden)
Puromycin	Sigma (Taufkirchen)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Taufkirchen)
RNase A	Sigma (Taufkirchen)
RNase-Free DNase Set	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
Sephadex G50	Pharmacia (Freiburg)

StreptABComplex/HRP	DAKO (Hamburg)
T4-Ligase	Roche (Boehringer; Mannheim)
Taq-DNA-Polymerase + 10x Puffer + Magnesiumchlorid	GeneCraft (Münster)
tetrazyklinfreies FCS	Biochrom (Berlin)
Trypsin/EDTA (1x)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Vectashield	Vector Laboratories (Peterborough, UK)
Vybrant® Dil cell-labelling solution	MoBiTec (Göttingen)
Whatman 3MM-Papier	Biometra (Göttingen)
X-Gal	Hybaid-AGS (Heidelberg)
Zellkulturflaschen, -platten	Falcon (Heidelberg)

3.2 Häufig verwendete Lösungen, Puffer und Medien

LB (Luria-Bertani)-Medium	1% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt, 1% NaCl; für Agarplatten wurden 1,5% Agar-Agar zugegeben
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O, im LB-Medium: 100 µg/ml
Puromycin	1 mg/ml in H ₂ O
Doxyzyklin-Hydrochlorid	100 µg/ml in H ₂ O für Zellkultur; 4 mg/ml in isotoner NaCl-Lösung für Nacktmäuse
Dibutyryl-cAMP (db-cAMP)	10 mg/ml in H ₂ O
Moscona-Lösung	140 mM NaCl, 9 mM D-Glucose-Monohydrat, 4 mM KCl, 12 mM NaHCO ₃ , 0,4 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 0,2 mM KH ₂ PO ₄
MOPS-Puffer (10x)	0,2 M MOPS, 2 M NaAc (pH 8,5), 0,5 M EDTA (pH 7,5); pH 7,0 mit 10 N NaOH einstellen
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ Citrat, pH 7,5
PBS/BSA-Puffer	0,5% BSA in PBS
TBE-Puffer (10x)	890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA
TE-Puffer (1x)	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Trypsin/EDTA-Lösung (TE)	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS
RNA-Ladepuffer (10x)	0,4% (w/v) Bromphenolblau, 0,4% (w/v) Xylencyanol, 1 mM EDTA, 50% Glycerin
DNA-Ladepuffer (6x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 30% Glycerin in H ₂ O
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml in H ₂ O

3.3 Molekularbiologische Arbeiten

3.3.1 Vektoren

Die Plasmidkarten der mit * markierten Plasmide sind im Anhang (siehe 8.1) zu finden.

Kommerziell erhältliche Vektoren

pBluescript SK +/-	Klonierungsvektor (Stratagene), Blau-Weiß-Selektion, Vektorgröße: 2,96 kb
pSG5	eukaryontischer Expressionsvektor mit SV40-Early- Promotor und einem Polyadenylierungssignal (Strata- gene), Vektorgröße: 5,2 kb
pBK-RSV	Eukaryontischer Expressionsvektor mit RSV-Promotor und G418-Resistenz (Stratagene), Vektorgröße: 4,4 kb
pGEM-5Zf(+)	Klonierungsvektor, Blau-Weiß-Selektion (Promega), Vektorgröße: 6,046 kb
pGL2-C	Luziferase-Reportervektor pGL2-C (Kontrollvektor) (Promega), enthält die codierende Region des

Luziferase-Gens, dient der Analyse der transkriptionellen Aktivität in transfizierten eukaryontischen Zellen, Vektorgroße: 3 kb

Zur Verfügung gestellte Vektoren

pBEHpac18	4,8 kb Vektor, enthält das ca. 1 kb große Puromycin-Resistenzgen (von K. Willecke, Bonn, zur Verfügung gestellt)
pBSK/polyA	pBluescript SK (+/-) mit 160 bp SV40-polyA-Fragment aus dem Vektor pSG5, über EcoRI/XbaI kloniert (3,16 kb) (von H.-D. Gabriel, Osnabrück, zur Verfügung gestellt)
pBSK/Cx26polyA	pBluescript SK(+/-) mit 1,2 kb Ratten-Cx26-Fragment und SV40-polyA-Sequenz (von H.-D. Gabriel, Osnabrück, zur Verfügung gestellt)
pPH3	6,4 kb Rc/CMV-Vektor (Invitrogen) mit Ratten-Cx40-cDNA / 1,164 kb Fragment, PCR-vermittelte Klonierung über HindIII/XbaI (Hellmann et al., 1996)
pPH4	5,8 kb pBK-RSV-Vektor (Stratagene) mit Ratten-Cx43-cDNA (Beyer et al., 1987) / 1,4 kb Fragment, über EcoRI kloniert (Hellmann, 1995)
pPH9	4,4 kb pSV.SPORT1-Vektor (Gibco BRL) mit Ratten-Cx26-cDNA / 1,2 kb Fragment (Zhang und Nicholson, 1989), über EcoRI kloniert (Hellmann et al., 1999)
pUHD10-3 *	Antwortplasmid, rtTA (reverser Transaktivator)-ansprechendes Plasmid (3,15 kb), induzierbare Expression von Genen unter der Kontrolle eines <i>minimal cytomegalovirus immediate-early</i> Promotors (P _m CMV) unterhalb von Tet-Operator-Sequenzen (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995)
pUHD172-1neo *	rtTA-codierender Vektor (7,1 kb), enthält ein G418-Resistenzgen (Gossen et al., 1995)
pUHC13-3	Luziferase-codierender Kontrollvektor mit P _m CMV-Promoter mit Tet-Operator-Sequenzen (Gossen und Bujard, 1992)
pA3 luc (α hCG-Promotor)	humaner α hCG-Promotor exprimierender Vektor mit nachgeschaltetem Luziferase-Gen (6,356 kb) (Pestell et al., 1994) (freundlicherweise von T. Kotlar, Chicago, US, zur Verfügung gestellt)
G172 (trCx43)	pBEHpac18::Cx43 trunkiert (K257stop) (5,571 kb); Expression von Maus-Cx43, dem die letzten 125 C-terminalen Aminosäuren fehlen (C-Terminus von Cx43: 155 Aminosäuren (AS): AS 227-382; trunkiertes Cx43: trCx43) (freundlicherweise von K. Maass, Bonn, zur Verfügung gestellt)

Generierte Vektoren

pBSK/Cx40	pBluescript SK +/- mit 1,164 kb Ratten-Cx40-Fragment aus dem Vektor pPH3, über HindIII/XbaI kloniert (4,122 kb)
pGEM-5Zf(+)/Cx40	pGEM-5Zf mit 1,164 kb Ratten-Cx40-Fragment aus dem Vektor pBSK/Cx40, über SacI/Sall kloniert (4,164 kb)

pBSK/Cx40_1	pBluescript SK +/- mit Apal/Nsil-Ratten-Cx40-Fragment (1,164 kb) aus dem Vektor pGEM-5Zf(+)/Cx40, über Apal/PstI kloniert (4,122 kb)
pUHD10-3/Cx43 *	pUHD10-3 mit 1,4 kb Ratten-Cx43-Fragment aus dem Vektor pPH4, über EcoRI kloniert (4,55 kb)
pUHD10-3/Cx40 *	pUHD10-3 mit 1,164 kb Ratten-Cx40-Fragment aus dem Vektor pBSK/Cx40_1, über SacII kloniert (4,317 kb)
pUHD10-3/Cx26 *	pUHD10-3 mit 1,2 kb Ratten-Cx26-Fragment aus dem Vektor pPH9, über EcoRI kloniert (4,353 kb)
pUHD10-3/trCx43 (G172) *	pUHD10-3 mit 771 bp Maus-Cx43-Fragment ohne den größten Teil des C-Terminus (Aminosäure 258 (Lysin) der codierenden Region in Stopcodon umgewandelt) aus dem Vektor G172 (trCx43, pBEHpac18::Cx43 trankiert), über EcoRI/BamHI kloniert (3,923 kb)
αhCG-PROM	pBluescript SK(+/-) mit 900 bp αhCG-Promotor-Fragment aus dem Vektor pA3 luc (αhCG-Promotor) (3,9 kb)
pBSK/Cx43polyA	pBSK/polyA mit 1,4 kb Ratten-Cx43-Fragment aus dem Vektor pPH4, über EcoRI kloniert (4,56 kb)
αhCG/Cx43polyA *	αhCG-PROM mit 1,56 kb Ratten-Cx43polyA-Fragment aus dem Vektor pBSK/Cx43polyA, über EcoRV/NotI kloniert (5,46 kb)
pBSK/Cx40polyA	pBSK/polyA mit SmaI/EcoRV-Ratten-Cx40-Fragment (1,164 kb) aus pBSK/Cx40_1, über EcoRV kloniert (4,324 kb)
αhCG/Cx40polyA	αhCG-PROM mit Ecl136II-Ratten-Cx40-Fragment aus dem Vektor pBSK/Cx40polyA, über EcoRV kloniert (5,224 kb)
αhCG/Cx26polyA	pBSK/Cx26polyA mit 900 bp αhCG-Promotor-Fragment aus dem Vektor αhCG-PROM, über XbaI kloniert (5,26 kb)

3.3.2 Transformation elektro-kompetenter Bakterien – Elektroporation

Bakterienstämme *Escherichia coli*

DH10B	erlaubt Blau-Weiß-Selektion; Genotyp: F ⁻ <i>mrcA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80d/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lac</i>)X74 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> (Invitrogen)
<i>Escherichia coli</i> „SURE“	erlaubt Blau-Weiß-Selektion; Genotyp: <i>e14-</i> (<i>McrA-</i>) Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>recB</i> <i>recJ</i> <i>sbhC</i> <i>umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)] (Stratagene)

50 µl kompetente *E. coli* „SURE“- oder DH10B-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz oder 10 µl salzfreier Plasmid-DNA (1:10 Verdünnung, 100 ng/µl) gemischt und in die Elektroporationsküvette (Peqlab) gegeben. Dann wurde die Küvette in den Gene Pulser II (BioRad) gestellt und 2,5 Volt (bei folgenden Einstellungen: 800 Ω, 25 µF) ausgesetzt. Sofort nach dem elektrischen Schock wurde 900 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotika in die Küvette gefüllt, dann der gesamte Ansatz in ein 10 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und 1 h bei 37°C auf einem Rotationsschüttler bei 180 Upm inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand abgeschüttet, 1 Tropfen vom Bakterienpellet auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C

inkubiert. Zur Blau-Weiß-Selektion von transformierten Bakterien wurde vorher IPTG (1 M, 4 µl pro Platte) und X-Gal (40 mg/ml, 50 µl pro Platte) auf die Agarplatte gegeben.

3.3.3 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Für Klonierungsarbeiten wurde das One Shot Kit (Top10F', Invitrogen) verwendet. 50 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz dazugegeben und mit der Pipettenspitze vorsichtig gemischt. Danach wurde der Ansatz 30 min auf Eis gestellt, für 30 sec bei 42°C im Thermoblock inkubiert (Hitzeschock) und wieder auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) wurde der Ansatz in ein 10 ml Röhrchen überführt und 1 h bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die transformierten Bakterien resuspendiert. Diese wurden dann auf einer LB-Platte ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Zur Amplifizierung einer Bakterienkolonie wurde diese in LB-Medium mit Ampicillin üN bei 37°C auf dem Rotationsschüttler kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde entweder mit dem Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) oder für eine Transfektion mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) isoliert.

Zur dauerhaften Lagerung von transformierten Bakterien wurden 150 µl steriles Glycerin als Frostschutzmittel und 850 µl Bakterienkultur gemischt und bei -80°C eingefroren.

3.3.4 DNA

3.3.4.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Eine Bakterienkolonie wurde von einer Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen, in ein vorbereitetes Glasröhrchen mit 3 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und üN bei 37°C auf dem Rotationsschüttler kultiviert. Die Plasmid-Isolierung verlief nach dem Prinzip der Alkalischen Lyse nach einem modifizierten Verfahren von Birnboim und Doly (1979). Die Bakterien wurden zuerst bei 14000 Upm im Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl eiskalter GTE-Lösung resuspendiert und die Zellen für 2 min bei 37°C im Thermoblock lysiert. Nach einer Inkubation bei RT für 3 min wurde 200 µl NaOH/SDS-Lösung zugegeben und der Reaktionsansatz sechsmal invertiert. Der Reaktionsansatz wurde durchsichtig. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 150 µl 3 M NaAc-Puffer (pH 5,2). Der Ansatz wurde wieder sechsmal invertiert und man konnte das Ausflocken von genomischen DNA/Protein-Komplexen beobachten. Nach einer Inkubation auf Eis für 5 min wurde der Ansatz 12 min bei RT zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 800 µl eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt. Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA. Daraufhin wurde für 20 min bei 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und gevortext. Nach einer weiteren 20 minütigen Zentrifugation wurde das Pellet vakuumgetrocknet, in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 60°C für 15 min im Heizblock gelöst.

GTE-Lösung	50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 25 µg RNase A (2 mg/ml; Sigma), 1 Spatelspitze Lysozym in H ₂ O
NaOH/SDS-Lösung	0,2 N NaOH, 1% SDS in H ₂ O

3.3.4.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) verwendet. 100 ml LB-Medium mit Ampicillin in Endkonzentration wurden mit Bakterien angeimpft und üN bei 37°C auf dem Rotationsschüttler kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll des Plasmid Maxi Kits durchgeführt. Die isolierte Plasmid-

DNA wurde in 300 µl TE-Puffer oder Aqua bidest aufgenommen und die Konzentration UV-spektrophotometrisch bestimmt (siehe 3.3.4.10).

Da sich die Endotoxine der Bakterien negativ auf die Zellen bei einer Transfektion auswirken können, wurde für Transfektionen der EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) verwendet. Dieser stellt endotoxinfreie Plasmid-DNA her. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.3.4.3 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Vorbereitung des Zielvektors und des Fragments für die Ligation wurden die beiden Vektoren mit Restriktionsenzymen enzymatisch gespalten. Restriktionsenzyme wurden von Boehringer (Mannheim) und AGS (Heidelberg) bezogen. Die Pufferbedingungen für die eingesetzten Enzyme wurden nach den mitgelieferten Tabellen der Hersteller gewählt. 1 µg Plasmid-DNA wurde in 1x Puffer mit 2,5 U eines oder mehrerer Restriktionsenzyme für 1,5 h bei 37°C im Thermoblock verdaut. Das Reaktionsvolumen wurde anhand der eingesetzten DNA-Menge gewählt; in der Regel 15 µl (1 µg DNA) und 30 µl oder mehr für 2-5 µg DNA.

3.3.4.4 Dephosphorylierung von DNA

Um Religationen des Zielvektors zu vermeiden, wurde durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (SAP, Shrimps Alkalische Phosphatase) eine Dephosphorylierung der DNA am 5'-Ende erreicht. Dazu wurde nach dem Restriktionsverdau des Zielvektors das Restriktionsenzym für 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wurde 1 µl SAP (1 U/µl) zugesetzt und 1 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Dann erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Alkalischen Phosphatase für 15 min bei 65°C. Der Zielvektor konnte danach durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.3.4.7) aufgetrennt und eluiert werden und stand zur Ligation mit verdauter und eluierter Insert-DNA zur Verfügung.

3.3.4.5 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Ligase

Die Verknüpfung der 5'-3'-Bindung von Zielvektor- und Insert-DNA bei einer Klonierung wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Es wurden 150 ng Zielvektor und 150 ng Insert-DNA zuerst üN bei -20°C gefällt (siehe 3.3.4.9). Der Reaktionsansatz wurde 20 min bei 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und vakuumgetrocknet. Dann wurde das Pellet in 3 µl Aqua bidest resuspendiert, 5 min bei 45°C gelöst, kurz auf Eis gestellt und mit 5 µl 2x Ligationspuffer, 1 µl 5x Ligationspuffer und 1 µl T4-Ligase versetzt. Der Ligationsansatz wurde für mindestens 3 h bei 16°C inkubiert und komplett mit chemisch-kompetenten Bakterien zur Transformation versetzt.

3.3.4.6 Auffüllen von DNA-Fragmenten mit 5'-überstehenden Enden (Klenow-Behandlung)

Für die Klonierung des Vektors pUHD10-3/Cx40 mußte eine Klenow-Behandlung von Zielvektor- und Insert-DNA durchgeführt werden. Nach dem Restriktionsverdau der DNA wurden dem Ansatz dNTPs (Endkonzentration 200 µM) und 5 U Klenow-Enzym (2 U/µl) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei RT. Nach einer Hitzeinaktivierung des Klenow-Enzyms bei 65°C für 15 min konnte die DNA weiter zur Ligation vorbereitet werden.

3.3.4.7 Auftrennung und Isolierung von DNA

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren der Größe nach aufgetrennt werden und mit Ethidiumbromid im Gel sichtbar gemacht werden. Je nach Größe (0,1–10 kb) der zu identifizierenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2%ige Gele verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Durch Zusatz von Ethidiumbromid-Lösung (20 µl einer 10 mg/ml Stammlösung auf 400 ml Agaroselösung), die in die DNA interkaliert, kann die Auftrennung der DNA unter dem

UV-Licht am Geldokumentationsgerät (Intas, Göttingen) analysiert und abgespeichert werden. Sichtbare DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN) wurde die DNA isoliert und von der Agarose getrennt. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Kits. Nach der Aufreinigung wurde ein Aliquot auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Konzentration in der Probe wurde UV-spektrophotometrisch bestimmt.

3.3.4.8 Sequenzierung von DNA

Alle Plasmidsequenzierungen wurden im Sequenzierlabor des Universitätsklinikums Essen oder bei MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Die Sequenzdaten wurden mit dem Sequenzvergleichsprogramm BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) in der EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*)-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) über das Internet ausgewertet.

3.3.4.9 Fällung von Nukleinsäuren

DNA bzw. RNA wurden zur Erhöhung der Konzentration durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 und 2,5x Volumen eiskaltem 100% Ethanol für mindestens 1 h bei -80°C oder üN bei -20°C gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 14000 Upm, 4°C , wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Ethanol-Überstandes wurde das Pellet vakuumgetrocknet und in Aqua bidest gelöst.

3.3.4.10 Konzentrationsbestimmung von DNA / RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA erfolgte durch Extinktionsmessung in Mikro-Quarzküvetten mit dem Spektralphotometer Gene Quant II (Pharmacia). Nukleinsäuren weisen in Lösung eine Absorption von UV-Licht mit einem Maximum von 260 nm auf. Dabei ist die Konzentration der Lösung proportional zur gemessenen Extinktion. Eine Extinktion von 1,0 entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml DNA.

3.3.5 RNA

3.3.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus soliden Tumorgeweben und humanen Gewebeproben (reife Plazenten (3. Trimenon) von normalen Geburten aus der Abteilung für Gynäkologie am Universitätsklinikum Essen) wurde mit Hilfe des RNeasy Midi Kits (QIAGEN) isoliert. Das in flüssigem Stickstoff eingefrorene und bei -80°C gelagerte Gewebe wurde in 3,8 ml RLT-Puffer mit einem Homogenisator (Polytron PT300, Kinematica AG) homogenisiert. Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen wurde der RNeasy Mini Kit (QIAGEN) eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit Moscona gewaschen, bevor die entsprechende Menge RLT-Lysispuffer und β -Mercaptoethanol hinzugegeben wurde. Daraufhin konnten die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und durch mehrfaches Aufziehen durch eine Kanüle (Terumo 23G x 1; 0,6 x 25 mm, NEOLUS) lysiert werden. Die Isolierung erfolgte dann gemäß des Protokolls des Herstellers.

Zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen in RNA-Proben wurde eine DNase-Behandlung mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets (QIAGEN) auf den Mini-Spinsäulen nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

3.3.5.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen für die Gene-Array-Analyse

Für die Gene-Array-Analyse wurde die Gesamt-RNA aus Zellen über den RNeasy Mini Kit mit nachfolgendem DNase-Verdau auf der Säule isoliert. Die RNA-Konzentration wurde auf

1,5 µg/µl durch Fällung eingestellt und das RNA-Pellet luftgetrocknet. Ungefähr 10 µl RNA-Probe wurde für die Analyse benötigt.

3.3.5.3 Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden 1,68%ige Formaldehyd-Agarosegele verwendet. Unter diesen denaturierenden Bedingungen wird die Bildung von RNA-Sekundärstrukturen verhindert und das Laufverhalten der RNA durch die Molekülgröße bestimmt. Die verwendeten Gele enthielten eine Endkonzentration von 2,2 M Formaldehyd in 1x MOPS-Laufpuffer. Es wurde 5 µg RNA in 3 µl RNase-freiem Wasser gelöst, die Probe mit RNA-Probenpuffer versetzt, der 1/10 Volumen 10x MOPS-Puffer, 1,6 M Formaldehyd und 50% deionisiertes Formamid enthielt, und für 15 min bei 60°C denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 100 V in 1x MOPS-Puffer nach Zugabe von RNA-Ladepuffer zu den Proben. Da dem RNA-Probenpuffer Ethidiumbromid zugesetzt wurde, konnte unter dem UV-Licht die Auftrennung der RNA in die 28S rRNA- und 18S rRNA-Bande beobachtet und die Qualität der RNA überprüft werden.

3.3.5.4 Northern-Blot-Analyse

Vektoren mit cDNA-Sonde

Cx43	Plasmid Cx43m-3c, Klonierungsvektor mit Maus-Cx43-cDNA-Fragment (1,3 kb), kann nach EcoRI-Restriktionsverdau isoliert werden (Beyer et al., 1987)
Cx40	Vektor SP64T mit einem 600 bp großen cDNA-Fragment des Ratten-Cx40, kann nach BglII/XhoI Restriktionsverdau isoliert werden (Haeffliger et al., 1992)
Cx26	Plasmid-DNA des Klons 26-1 (Zhang und Nicholson, 1989), enthält ein 1,1 kb großes EcoRI-cDNA-Fragment, das den codierenden Bereich des Ratten-Cx26 enthält
GAPDH	Plasmid pGAPDH mit einem 1,2 kb großem cDNA-Fragment des humanen GAPDH, kann nach PstI-Restriktionsverdau isoliert werden (Hanauer und Mandel, 1984)

Der Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte erfolgte durch Hybridisierung von membrangebundener Gesamt-RNA mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden. Dazu wurde die RNA auf eine Hybond-N-Nylonmembran (Amersham) durch Kapillarkräfte unter Verwendung von 20x SSC transferiert. Der Blotaufbau entsprach der Beschreibung von Sambrook et al. (1989). Der Transfer der RNA dauerte ungefähr 10-16 h. Die RNA auf der Nylonmembran wurde anschließend für 2 h bei 80°C fixiert.

Zur Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurde die Nylonmembran mit der RNA-Seite nach innen in eine Glasröhre gelegt. Es wurden 10 ml RNA-Hybridisierungslösung und 100 µl Heringssperma-DNA zugegeben und 2 bis 24 h bei 42°C im Hybridisierungssofen vorhybridisiert, um unspezifische DNA-Bindungen zu vermeiden. Die DNA-Sonde wurde mit der *random primed labelling*-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert. Für diese Methode wurde der Multiprime DNA Labelling Kit (Amersham) verwendet. Es wurden 25 ng DNA mit 10 µl Nukleotidpuffer, 5 µl Primer, 2 µl Klenow-DNA-Polymerase und 2 µl α -³²P-dCTP mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 31 µl versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Vorher wurde die DNA bei 100°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden 150 µl TE-Puffer zugegeben und die nicht gebundenen Nukleotide über eine Sephadexsäule abgetrennt. Zur Herstellung der Sephadexsäule wurde eine 1 ml-Spritze mit silikonisierter Glaswolle gefüllt. In die Spritze wurde 1 ml Sephadex G50 (Pharmacia) gefüllt und die Säule 10 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Jetzt konnte die radioaktiv markierte cDNA-Sonde über die Säule aufgereinigt werden.

Zur Enzyminaktivierung wurde die Probe für 5 min aufgekocht, kurz abgekühlt und in die Hybridisierungslösung überführt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C üN. Dann wurde die Membran 1 h in Waschpuffer I und 30 min in Waschpuffer II gewaschen. Nach den Waschschritten wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und zur Exposition in eine Röntgenkassette gelegt. Die Autoradiographie erfolgte durch Auflage eines Röntgenfilms (Kodak XAR-5) für 1-7 Tage bei -80°C. Für eine erneute Hybridisierung der Membran wurde diese 1 h bei 80°C in autoklaviertem H₂O gekocht, um die alte Sonde von der Membran zu entfernen. Zur semiquantitativen Auswertung wurden alle Membranen mit einer GAPDH-Sonde rehybridisiert.

RNA-Hybridisierungslösung	55% deionisiertes Formamid, 10% Dextransulfat, 0,8% SDS, 1 M NaCl, 10 µg/ml Heringssperma-DNA
Waschpuffer I	0,1% SDS in 1x SSC
Waschpuffer II	0,1% SDS in 0,5x SSC

3.3.6 Semiquantitative RT-PCR

Mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) kann durch den Einsatz von genspezifischen Primern eine beliebige DNA-Sequenz amplifiziert werden.

Für den Nachweis von spezifischen Transkripten in Zellen oder Geweben wurde die Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. An der mRNA wird unter Verwendung von Primern und Reverser Transkriptase ein komplementärer cDNA-Strang synthetisiert. Dieser RNA/cDNA-Doppelstrang dient dann als Matrize für die nachfolgende PCR-Reaktion.

3.3.6.1 Verwendete Oligonukleotid-Primer und deren Charakteristika

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Tab. 2: Charakteristika der verwendeten Oligonukleotide

Primer-Bezeichnung	Strang	Sequenz (5'→3')	Genbank-Nummer	Position	Fragmentgröße (bp)
β-Aktin-F	sense	ACCAACTGGGACGACATGGAGAAAA	NM_001101	302-326	214
β-Aktin-R	antisense	TACGGCCAGAGGCGTACAGGGATAG		491-515	
β-Aktin-1	sense	ACCTTCAACACCCAGCCATGTACG	NM_001101	449-473	698
β-Aktin-2	antisense	CTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGG		1122-1146	
NOV-F ¹	sense	CACGGCGGTAGAGGGAGATA	NM_002514	378-397	251
NOV-R ¹	antisense	GGGTAAGGCCTCCAGTGAA		609-628	
ZO-1-up ²	sense	CGGTCCTCTGAGCCTGTAAG	L14837	3816-3835	371
ZO-1-dw ²	antisense	GGATCTACATGCGACGACAA		4167-4186	
Occludin-up*	sense	TGGTGGAGAGATGCATGTTC	AF400624	216-235	665
Occludin-dw*	antisense	ACCCAGTACAATGGCAATG	AF400625	190-211	
βhCG-F	sense	TGCATCACCGTCAACACCACCAT	J00117	161-183	293
βhCG-R	antisense	GCCTTTGAGGAAGAGGAGTCCTG		431-453	
mCx43-F*	sense	ACAGACAGGTCTGAGAGCCCGAAC	L10387	304-327	784
mCx43-R*	antisense	GAGCTCAATGATATTCAGAGCGAG	X62836	816-839	
Tet-up ³	sense	TAACAACCCGTAAACTCGCCAGAAGCTTG	CVU89930	866-875	969
Tet-dw ³	antisense	AATGTATCTTATCATGTCTGGATCGTCGCG		1805-1834	
EGFR-up	sense	ATCATCAGAGGAAATATGTAC	NM_005228	502-522	460
EGFR-dw	antisense	TGGCTTCGTCTCGGAATTTGC		941-961	

¹ aus Manara et al., 2002

² aus Youakim und Ahdieh, 1999

³ rTA-spezifische Primer, Sequenz aus Plasmid pUHD172-1neo; Gossen et al., 1995

* intronüberspannend

3.3.6.2 DNase-Behandlung der Gesamt-RNA vor der Reversen Transkription

Vor der Reversen Transkription wurde ein DNase-Verdau der RNA durchgeführt. Dazu wurden 2 µg Gesamt-RNA, 2 µl DNase I-Reaktionspuffer und 2 µl DNase I (1 U/µl) auf ein Endvolumen von 20 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert und die DNase I durch die Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA-Lösung inaktiviert.

3.3.6.3 Reverse Transkription

Zur Beseitigung von Sekundärstrukturen wurde die DNase-verdaute RNA-Probe für 10 min bei 65°C im Thermocycler (Biometra, Göttingen) denaturiert. Danach wurde der Reaktionsansatz kurz auf Eis gestellt, der RT-Mix (28 µl pro Probe) hinzugegeben und 1 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Denaturierung des RNA/cDNA-Doppelstranges wurde der RT-Ansatz (50 µl) anschließend für 5 min bei 90°C denaturiert und auf Eis gestellt. 4 µl des RT-Ansatzes wurden zur cDNA-Amplifikation als Matrize in die PCR eingesetzt.

RT-Mix

10 µl 5x RT-Puffer
2,5 µl dNTP-Mix (10 mM)
1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/µl)
2 µl DTT (0,1 M)
1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U)
11,5 µl RNase-freies Wasser

3.3.6.4 PCR

Um die Expression eines bestimmten Gens nachzuweisen, wurden 4 µl des RT-Ansatzes in die PCR eingesetzt. Zum Vergleich der relativen Expression eines Gens in unterschiedlichen Zellklonen oder Geweben wurde die semiquantitative RT-PCR angewendet. Hierfür wurde gleichzeitig die cDNA des zu untersuchenden Gens und die cDNA von β -Aktin, einem konstitutiv exprimierten Gen, als endogene Kontrolle in einem Reaktionsansatz amplifiziert. Pro PCR-Zyklus werden drei verschiedene Temperaturen durchlaufen. Ein typisches Temperaturprofil besteht aus einer Denaturierung, d.h. Doppelstrangtrennung bei 94°C, dem Annealing, der Anlagerung der Primer an die einzelsträngige Matrize bei einer durch die Primer festgelegte Temperatur und der Elongation bei 72°C, der Synthese des Doppelstranges durch die Taq-Polymerase. Dieser PCR-Zyklus wurde 30-40 mal je nach verwendeter Primerkombination wiederholt (Reaktionsbedingungen siehe Tab. 3). Die Reaktionsbedingungen für die semiquantitative RT-PCR wurden so gewählt, daß die Amplifikation auch noch im letzten PCR-Zyklus im exponentiellen Bereich verlief, um eine quantitative Auswertung möglich zu machen. Abhängig von der Transkriptgröße des Zielgens wurden verschiedene β -Aktin-Primer für verschiedene Transkriptgrößen bei der Amplifikation von β -Aktin als endogene Kontrolle verwendet. Jedes RT-PCR-Experiment wurde mindestens zweimal durchgeführt. Der gesamte PCR-Ansatz (50 µl) wurde auf Eis pipettiert und zum Schluß die Taq-Polymerase hinzugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte automatisch in einem Thermocycler. Nach Beendigung der Reaktion wurde der gesamte PCR-Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 2%-Gel aufgetrennt und die Signalstärke der PCR-Produkte densitometrisch mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes und der Gelscan Professional V4.0 Software (Gel Imager, Intas) ausgewertet. Die Expression des zu untersuchenden Gens wurde gegen die des β -Aktins abgeglichen, quantifiziert und graphisch dargestellt.

PCR-Ansatz

4 µl RT-Ansatz
 5 µl 10x PCR-Puffer + MgCl₂
 1,5 µl dNTP-Mix (10 mM)
 25-50 pmol sense-Primer
 25-50 pmol antisense-Primer
 2-25 pmol β-Aktin sense-Primer
 2-25 pmol β-Aktin antisense-Primer
 2,5 U Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
 ad 50 µl Aqua bidest

PCR-Profil

1 min	94°C	} 30-40 Zyklen
1 min	94°C	
1 min	T _m	
90 sec	72°C	
10 min	72°C	

Tab. 3: Reaktionsbedingungen der semiquantitativen RT-PCR

Primerpaar	T _m (°C)	Reaktionszyklen	Primerkonzentration (pmol/µl)	verwendetes β-Aktin-Paar (Primerkonzentration)
NOV-F/R	59	40	50	β-Aktin-1/2 (2 pmol/µl)
ZO-1-up/dw	58	30	25	β-Aktin-1/2 (2 pmol/µl)
Occludin-up/dw	59	30	25	β-Aktin-F/R (25 pmol/µl)
βhCG-F/R	62	30	25	β-Aktin-1/2 (2 pmol/µl)
mCx43-F/R	62	34	50	β-Aktin-F/R (12,5 pmol/µl)
Tet-up/dw	65	40	25	β-Aktin-F/R (25 pmol/µl)
EGFR-up/dw	54	30	25	β-Aktin-F/R (25 pmol/µl)

T_m (°C): verwendete Annealingtemperatur in der PCR

3.3.7 Gene-Array-Analyse

Mit Hilfe von Gene-Arrays können cDNA-Expressionsmuster von mehreren tausend Genen in Zelllinien und Geweben analysiert werden. Dabei wird jedes Transkript durch 16 *probe sets* bestehend aus je 25 Oligonukleotiden auf der Oberfläche des Arrays repräsentiert. Die bei der Hybridisierung des Arrays mit einer markierten cRNA auftretende Signalstärke des *probe sets* wird zur Messung der Expression verwendet.

Die Gene-Array-Analysen wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen, im Affymetrix cDNA-Array-Zentrum in Zusammenarbeit mit PD Dr. Klein-Hitpass durchgeführt.

Es wurde der Gene-Array HG_U95Av2 (Bestell-Nr. 900304) von Affymetrix (USA) mit ca. 6000 Genen und 6000 EST's (*expressed sequence tags*) verwendet.

Die Gesamt-RNA wurde DNA-frei aus den Zellen isoliert, wie oben unter 3.3.5.2 beschrieben.

Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurden 9 µl (13,5 µg) der Gesamt-RNA mit 1 µl einer Mischung aus drei polyadenylierten Kontroll-RNA's, 1 µl 100 µM T7-Oligo(dT)₂₄ Primer für 10 min bei 70°C inkubiert und auf Eis gelagert. Dann wurden 4 µl 5x Erststrang-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP's zugegeben und der Reaktionsansatz bei 42°C für 2 min vorinkubiert. Es folgte die Reverse Transkription unter Zugabe von 2 µl (200 U) Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) für 1 h bei 42°C. Für die Zweitstrang-Synthese wurde 30 µl 5x Zweitstrang-Puffer, 91 µl RNase-freies Wasser, 3 µl 10 mM dNTP's, 4 µl (40 U) *E. coli* DNA-Polymerase I (Invitrogen), 1 µl (12 U) *E. coli* DNA-Ligase (TaKaRa, Frankreich) und 1 µl (2 U) RNase H (TaKaRa) zugegeben und der Reaktionsansatz für 2 h

bei 16°C inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 2,5 µl (10 U) T4 DNA-Polymerase I (TaKaRa) für 5 min bei 16°C. Die Reaktion wurde durch 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt, die Doppelstrang-DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und die wäßrige Phase durch eine *phase lock gel separation* getrennt. Nach der Präzipitation wurde die cDNA in 12 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

5 µl der doppelsträngigen DNA wurde für die Synthese biotinylierter cRNA mit Hilfe des BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kits (Enzo Diagnostics, USA) in der *in vitro*-Transkription eingesetzt. Markierte cRNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit aufgereinigt. Fragmentierung der cRNA, Hybridisierung mit cDNA-Gene-Arrays HG_U95Av2, Waschen, Färben und Scannen der Arrays erfolgte nach den Angaben im Affymetrix-Protokoll.

3.3.7.1 Absolute und vergleichende Analyse

Absolut- und vergleichende Analysen wurden mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite 4.0 und 5.0 (MAS 4.0, 5.0) durchgeführt. In der Absolut-Analyse wurde die Signal-Intensität für jedes *probe set*, der *detection p-value* (Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines Transkripts; enthält benutzerdefinierte Parameter) und der *detection call* (Transkript ist vorhanden (*present*), grenzwertig vorhanden (*marginal*) oder nicht vorhanden (*absent*)) der Transkripte ermittelt. In der vergleichenden Analyse zweier Arrays zur Ermittlung und Quantifizierung von Unterschieden in der Genexpression wurde die Änderung der Genexpression als quantitativer Wert (*signal log ratio*, umgerechnet in *fold change*) und der *change call* (Genexpression ist erhöht (*increased*), grenzwertig erhöht (*marginal increased*), erniedrigt (*decreased*), grenzwertig erniedrigt (*marginal decreased*) oder nicht verändert (*no change*)) bestimmt. Zudem wurde anhand des *change p-values* die Wahrscheinlichkeit der Änderung der Genexpression berechnet. Alle Arrays wurden dabei auf die *Target*-Intensität von 1000 global skaliert. Um unterschiedlich exprimierte Gene in der vergleichenden Analyse zweier Experimente zu finden, wurde mit Hilfe der Affymetrix Data Mining Tool 3.0 Software (DMT 3.0) weiter unter der Verwendung bestimmter *cut-offs* gefiltert. In dieser Arbeit wurde ein benutzerdefinierter *cut-off* der Änderung der Genexpression von 1,5 und 2,5 (*fold change*) gewählt. Ein weiterer Filter grenzte den *change p-value* ein ($< 0,001$ bzw. $> 0,999$).

3.3.7.2 Hierarchisches Clustering und statistische Analyse

Die hierarchische Cluster-Analyse wurde mit dem Software-Programm Spotfire Decision Site 7.0 durchgeführt. In diese wurden nur Gene einbezogen, die von der Affymetrix-Software als exprimierte Gene (*detection call = present*) erkannt wurden (mindestens ein *present call* pro experimenteller Gruppe). Außerdem wurde eine Änderung der Genexpression von 2 (*fold change*) festgelegt. Ungefähr 5000 bis 6000 Gene wurden selektiert und in die Cluster-Analyse einbezogen.

Die statistische Auswertung der Genexpressionsunterschiede zwischen zwei experimentellen Gruppen wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Signifikanztests mit dem Affymetrix Data Mining Tool 3.0 durchgeführt. Dafür wurden die Mittelwerte der Signalstärken der *probe sets* der einen experimentellen Gruppe durch die Mittelwerte der Signalstärken der anderen experimentellen Gruppe dividiert. Diese Auswertung war unabhängig vom *detection*- und *change call* der Transkripte. Bei einem p-Wert kleiner als 0,05 ($p \leq 0,05$) wurden statistisch signifikante Unterschiede angenommen.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinien

Jeg3

erworben von der American Type Culture Collection (ATCC HTB-36; Kohler und Bridson, 1971). Diese humane Chorionkarzinomzelllinie ist klonal aus BeWo-

	Zellen (humane Chorionkarzinomzellen, ATCC CCL 98) entstanden.
bEnd3	Maus-Endothelzelllinie, PymT-transformiert aus Gehirn-Mikrogefäßen (Montesano et al., 1990) (freundlicherweise von P. Meda, Genf, zur Verfügung gestellt)
HeLa-Tet-On	erworben von Clontech, humane Zervixkarzinomzelllinie, die den reversen Tetrazyklin kontrollierten Transaktivator (rtTA) exprimiert

Zellkulturmedien

Zelllinien

Jeg3	<i>Minimum essential medium</i> (MEM), 10% FCS, 2 mM L-Glutamin
bEnd3	<i>Dulbeccos modified eagles medium</i> (DMEM), 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
HeLa-Tet-On	DMEM, 10% tetrazyklinfreies FCS, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml G418

Zelltransfektanten

Jeg3- α hCG	Jeg3-Medium, 500 µg/ml G418
Jeg3-Tet	Jeg3-Medium, 500 µg/ml G418, 0,5 µg/ml Puromycin
HeLa-Tet	HeLa-Tet-On-Medium, 0,5 µg/ml Puromycin

Alle Tet-Transfektanten erhielten Medium mit tetrazyklinfreiem FCS.

3.4.2 Kultivierungsbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂/95% O₂ in einem befeuchteten Brutschrank (Nuaire) kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Als Kultivierungsgefäße wurden Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² (T25) und 75 cm² (T75) verwendet. Für experimentelle Ansätze wurden auch 10 cm-Petrischalen, 6-well-, 12-well-, 24-well- und 96-well-Kulturplatten eingesetzt. Die verwendeten Kulturmedien wurden durch Filtration sterilisiert, Glasgeräte bei 180°C 8 h hitzesterilisiert und Plastikartikel bei 120°C und 1,2 bar 20 min autoklaviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt. Zum Passagieren der Zellen in neue Zellkulturflaschen wurde bei Konfluenz der Kultur das Kulturmedium abgesaugt und der Zellmonolayer mit Moscona-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation der Zellen mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung bei 37°C, um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen (Trypsinierung). Nach Resuspension in Kulturmedium wurden die Zellen in unterschiedlicher Verdünnung in neue Zellkulturflaschen überführt.

Für die Induktion der Connexin-Expression in den Tet-Transfektanten wurde das Kulturmedium mit 1 µg/ml Doxzyklin (Dox) versetzt.

Eine Verstärkung der Cx43-Expression in den Jeg3- α hCG/Cx43-Transfektanten erfolgte über die Gabe von 1 mM Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) ins Kulturmedium.

3.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Ein konfluent Monolayer einer T75-Zellkulturflasche wurde trypsiniert und in 6 ml Kulturmedium resuspendiert. Zum Entfernen des Trypsins wurden die Zellen 8 min bei 800 Upm in einer Heraeus Labofuge zentrifugiert und das Zellpellet in 6 ml Kulturmedium aufgenommen. Je 1,8 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryogefäß (Cellstar, Greiner) überführt und mit 10% DMSO als Frostschutzmittel versetzt. Das Einfriergefäß wurde drei-

bis viermal invertiert und bei -80°C oder im Stickstoffdampf eingefroren. Die längerfristige Lagerung der Zellen erfolgte bei -196°C im flüssigen Stickstoff.

Zum schnellen Auftauen der Zellen wurde das Kryogefäß in einem 37°C warmen Wasserbad geschwenkt und die Zellsuspension in 5 ml 37°C warmen Kulturmedium in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 800 Upm zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche verteilt. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.4.4 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Für *in vitro*-Untersuchungen von Proteinfunktionen wird Fremd-DNA durch Transfektion in Zellen eingebracht. In dieser Arbeit wurde die Liposomen-Technik mit dem LipofectAmine Reagenz (Gibco BRL) verwendet. Es wurden sowohl transiente als auch stabile Transfektionen durchgeführt.

3.4.4.1 Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion wurde meist als Kotransfektion mit dem Connexin-Expressionsvektor und einem Resistenzgen enthaltenden Plasmid als Kotransfektionsplasmid durchgeführt. Als Vektorkontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (Vektor ohne Connexin-Insert) und dem Resistenzplasmid kotransfiziert.

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen mit dem Zellcounter (Casy1, Schärfe-System) gezählt und 3×10^4 (HeLa-Tet-On) bzw. $6-8 \times 10^4$ Jeg3-Zellen in 6-well-Platten ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium abgezogen und der Monolayer zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen. Ein Transfektionsansatz für ein well enthielt 1,5 µg Transfektionsplasmid-DNA und 1,5 µg Kotransfektionsplasmid-DNA in 300 µl serum-reduziertem OptiMEM-Medium (Lösung A). Ein weiterer Ansatz enthielt 9 µl LipofectAmine und 300 µl OptiMEM-Medium (Lösung B). Beide Lösungen wurden vereinigt, zweimal invertiert und 30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen mit anschließender Inkubation von 6 h in einem 37°C CO_2 -Inkubator. Nach 6 h Inkubation wurde der Transfektionsansatz abgezogen, die Zellen einmal mit Moscona-Lösung gewaschen und Kulturmedium zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen trypsinisiert und je well auf eine 10 cm-Petrischale gebracht. 2 Tage nach der Transfektion begann die Selektion auf Resistenz. Die vermittelte Resistenz ist vom verwendeten Vektorsystem abhängig. Es wurden zwei verschiedene Resistenzen eingesetzt, zum einen G418-Sulfat und zum anderen Puromycin. Die verwendeten Höchstdosen der beiden Antibiotika wurden für jede Zelllinie experimentell ermittelt (siehe nächsten Abschnitt). Die αhCG -Transfektanten wurden mit pBK-RSV kotransfiziert. Dieser Vektor enthält das Neo-Gen, welches eine G418-Resistenz verleiht. Die HeLa-Tet-Transfektanten wurden mit pBEHpac18 kotransfiziert, welches ein Puromycin-Resistenzgen trägt. Die Jeg3-Tet-Transfektanten wurden in der 1. Transfektion mit pUHD172-1neo transfiziert. Dieser Vektor vermittelt bereits eine G418-Resistenz. Bei der 2. Transfektion der erhaltenen stabilen Zellklone mit den Cx-exprimierenden Plasmiden wurde mit pBEHpac18 kotransfiziert. Während G418 zwei Tage nach der Transfektion in seiner Endkonzentration zugesetzt wurde, war für die Puromycinselektion eine stufenweise Erhöhung der Konzentration notwendig. Begonnen wurde mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml Puromycin. Nach zwei Tagen wurde auf eine Konzentration von 0,3 µg/ml, nach weiteren zwei Tagen auf 0,4 µg/ml bis zur Endkonzentration von 0,5 µg/ml Puromycin erhöht. Das Absterben der nicht resistenten Zellen und die Bildung von Zellkolonien wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen beobachtet. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Unter Selektionsdruck gewachsene Kolonien (mindestens 100 Zellen) wurden gepickt, einzeln trypsinisiert und in 24-well-Platten überführt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit Moscona-Lösung gewaschen. Dann wurde 5 ml Moscona-Lösung in die Petrischale gegeben, jede sichtbare Zellaggregation mit einer sterilen gelben Pipettenspitze vorsichtig abgekratzt, mit 50 µl Moscona-Lösung in die Pipettenspitze aufgesaugt und zum

Trypsinieren in eine 96-well-Platte überführt. Jede Zellkolonie wurde mit 50 µl Trypsin/EDTA-Lösung versetzt, 10 min bei 37°C inkubiert, mit 70 µl Selektionsmedium resuspendiert und vereinzelt. Danach wurden die gepickten Zellklone in 24-well-Platten einzeln überführt, hochgezogen und weiter analysiert.

3.4.4.2 Optimierung der Antibiotika-Konzentration für die Selektion transfizierter Zellen

Zur Optimierung der G418-Konzentration für die Selektion stabil transfizierter Zellen wurden je 3×10^4 Zellen in 12-well-Platten ausplattiert, kultiviert und unterschiedlichen Mengen des zu testenden Antibiotikums ausgesetzt. Für G418 wurden die Konzentrationen 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1 mg und 1,5 mg pro ml Kulturmedium getestet. In einem 2. Testversuch wurde die G418-Konzentration noch weiter eingeschränkt und 450 µg, 500 µg, 550 µg, 600 µg und 650 µg pro ml Kulturmedium getestet. Bei Puromycin erfolgte die Gabe von folgenden Mengen: 0,2 µg, 0,5 µg, 0,8 µg, 1 µg und 1,5 µg pro ml Kulturmedium. Auch hier wurde die Menge an Puromycin durch Austesten weiterer Konzentrationen noch näher festgelegt. Die Antibiotika-Konzentration, bei der etwa 80% der Zellen nach einer Woche abgestorben waren, wurde für die Selektion stabil transfizierter Zellen eingesetzt.

3.4.4.3 Transiente Transfektion

Der Versuchsablauf der transienten Transfektion stimmte mit dem der stabilen Transfektion überein. Jedoch erfolgte nach der Transfektion keine Selektion resistenter Zellklone. Stattdessen wurden die Zellen 48 h nach Beendigung der Inkubation mit dem Transfektionsansatz im Luziferase-Assay analysiert.

3.4.4.4 Kontrolle der basalen Aktivität des reversen Transaktivators (rtTA) im Luziferase-Assay

Die basale Aktivität des rtTA-Gens in den pUHD172-1neo-transfizierten Jeg3-Zellklonen wurde mit Hilfe des Luziferase-Assays ermittelt. Es erfolgte eine transiente Transfektion von drei Zellklonen jeweils mit pGL2-C und pUHC13-3. Nach der Transfektion der Klone mit pUHC13-3 wurden je 3 wells für 48 h mit 1 µg/ml Doxzyklin kultiviert und 3 wells ohne Doxzyklin-Gabe. Außerdem wurden 3 wells mit dem Kontrollvektor pGL2-C transfiziert.

Zur Ermittlung der Luziferase-Aktivität wurden 2 µg des Kontrollvektors pGL2-C und jeweils äquimolare Mengen zu testender Vektor pUHC13-3 eingesetzt, d.h. die Größe der Vektoren wurden mit dem Gewicht verrechnet. Als Beispiel: Größe pGL2-C: 6046 bp, hypothetische Größe des Testvektors: 6487 bp; $6487:6046 = 1,07$ (Faktor). Es mußte also $2 \mu\text{g} \times 1,07 = 2,15 \mu\text{g}$ vom zu testenden Vektor in der Transfektion eingesetzt werden. Die Zellen wurden 6 h mit dem Transfektionsansatz inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz abgesaugt, die Zellen zweimal mit kalter Moscona-Lösung gewaschen und 250 µl Lyse-Reagenz des Luziferase-Kits laut Protokoll des Herstellers zugegeben. Die Zellen wurden 10 min bei RT inkubiert, dann mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Zell-Lysat wurde kurz gevortext und für 2 min in einer Kühlzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und sofort bei -80°C bis zur Messung der Luziferase-Aktivität eingefroren. Die Messung der Luziferase-Aktivität wurde durch Zugabe von Substrat A und B nach den Angaben des Herstellers am Luminometer Lumat LB9501 durchgeführt. Es wurden jeweils 25 µl des Zell-Lysates zur Messung eingesetzt.

Die Expression des Luziferase-Gens im Vektor pUHC13-3 konnte durch die Expression des reversen Transaktivators in den getesteten Zellklonen gesteuert werden. Durch die Ermittlung der Luziferase-Aktivität wurden die Klone ermittelt, die eine mittlere basale Aktivität des rtTA aufwiesen und eine gute Regulation mit einer geringen Aktivität im uninduzierten Zustand zeigten.

3.4.5 *In vitro*-Proliferationsassay

Die *in vitro*-Proliferationsmessungen der Zelltransfektanten wurden von Sven Propson im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit unter meiner Betreuung durchgeführt.

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden 5×10^3 Zellen/well in 12-well-Kulturplatten ausplattiert und jeweils drei Parallelproben pro Versuchsansatz gemessen. Die Gesamtzellzahl wurde am 2., 5., 7. und 10. Tag nach dem Ausplattieren mit dem Zellcounter (Casy1, Schärfe-System) ermittelt.

3.4.6 β hCG-Bestimmung im Überstand von kultivierten Zellen

Chorionkarzinomzellen produzieren, wie humane Trophoblastzellen, humanes Choriongonadotropin (hCG). Die trophoblastspezifische β hCG-Produktion kann als Differenzierungsparameter herangezogen werden. Die Bestimmung des β hCG-Gehaltes im Medium der Jeg3-Tet-Transfektanten wurde parallel zu den *in vitro*-Proliferationsmessungen durchgeführt. Dazu wurde jeweils vor der Zellzählung am Tag 2, 5, 7 und 10 nach dem Ausplattieren das Medium (1 ml) des zu zählenden wells abgenommen, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C bis zur Laborbestimmung aufbewahrt. Die β hCG-Bestimmung in den entnommenen Medien wurde im Labor der Abteilung für Gynäkologie mit dem Clinical AssaysTM Gamma Dab® M [^{125}I] β hCG Radioimmunoassay Kit (Incstar Corporation, USA) durchgeführt. Es handelt sich um einen immunradiometrischen Assay, in dem das gesamte hCG-Molekül sowie die freien hCG- β -Untereinheiten durch ^{125}I -markierte Antikörper erkannt werden. Der Meßbereich lag bei 5-400 mU/ml.

Zum Vergleich der quantitativen Hormonproduktion wurden jeweils 3 Parallelproben der am 10. Tag entnommenen Medien analysiert und das Ergebnis als mU β hCG pro Zelle pro 24 h graphisch dargestellt.

3.4.7 Farbstoff-Transfer-Assay und FACS-Analyse zur quantitativen Ermittlung der Zellkopplung

Um den Grad des Kopplungsvermögens mittels Gap Junction-Kanäle in transfizierten Zellen zu analysieren, wurde der *Parachute Assay* angewendet und für diese Arbeit leicht modifiziert (Ziambaras et al., 1998; Czyz et al., 2000). Diese Methode basiert auf dem Transfer von Calcein von Calcein gefärbten Donorzellen zu Akzeptorzellen. Der Farbstoff Calcein-AM ist membranpermeabel. Intrazellulär kommt es zu einer Spaltung von Calcein-AM durch unspezifische Esterasen und es entsteht das polyanionische, grün fluoreszierende Calcein, welches nicht mehr membrangängig ist, sondern nur noch über die Gap Junction-Kanäle ausgetauscht werden kann. Wenn Calcein gefärbte Donorzellen zu einem Zellmonolayer gegeben werden, koppeln diese innerhalb von 30-60 min mit den Zellen im Monolayer und man kann im Fluoreszenzmikroskop einen Fluß des Calceins von den Donor- zu den Akzeptorzellen beobachten.

Für dieses Verfahren wurde eine Farbstoff-Beladungstechnik mit der fluoreszenzaktivierten Durchflußzytometrie (FACS) kombiniert. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dürig, Abteilung für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt. 24 h vor dem Experiment wurden die Akzeptorzellen ($1,5 \times 10^5$ bEnd3-Zellen/well; 5×10^5 Jeg3-Zellen/well) auf 6-well-Kulturplatten ausplattiert, um am nächsten Tag einen konfluenten Monolayer zu erhalten. Um die Donorzellen mit dem Farbstoff Calcein-AM (Kat. Nr. C-3100, MoBiTec) zu beladen, wurden die Zellen trypsinisiert, in Zellkulturmedium resuspendiert, zentrifugiert und in 2 ml der Calcein-Färbelösung (5 μM Calcein-AM und 0,2% Glucose in PBS) resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert, bevor sie in Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit dem Zellcounter bestimmt wurde. Die Akzeptorzellen wurden mit dem membranständigen, rot fluoreszierenden Farbstoff Dil (Kat. Nr. C-7000, MoBiTec) zur besseren Unterscheidung der beiden Zellpopulationen beladen. Die Färbung erfolgte direkt in der Zellkulturplatte mit einer Dil-Färbelösung (5 μM Dil und 0,2% Glucose in

PBS) für 30 min bei 37°C im Brutschrank. In einigen Versuchen wurde auch eine Vybrant® Dil cell-labelling solution (Kat. Nr. V-22885, MoBiTec), eine Fertig-Dil-Färbelösung, eingesetzt. Dazu wurde 5 µl Dil-Lösung pro 1 ml MEM-Kulturmedium auf die Zellen gegeben und für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Dil-Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Es wurden 9×10^4 Donorzellen zu einer konfluenten Monolayer-Kultur von Dil gefärbten Akzeptorzellen gegeben und 4 h kokultiviert. Ebenso wurden als Kontrolle auch Dil gefärbte Akzeptorzellen ohne Donorzellen kultiviert. Danach wurden die Zellen trypsiniert, in Kulturmedium resuspendiert, zentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Da die Zellen, besonders die Jeg3-Zellen, auch nach dem Resuspendieren noch zahlreiche Zellaggregate aufwiesen, wurden sie durch ein Molekularsieb (\varnothing 150 µm) gegeben. Die Zellen konnten jetzt im FACS-Gerät (FACScan flow cytometer, Becton Dickinson) mit Hilfe der Software Cell Quest analysiert werden. Es wurden 2-4 unabhängige Experimente pro Versuchsansatz durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm aufgenommen. Pro Probe wurden 10.000 Zellen gemessen. Die Versuchsansätze wurden hinsichtlich der Akzeptorzell-Population durch ein elektronisches Auswählen dieser Zellpopulation (*gating*) analysiert. Sie war im *dot plot* in der oberen linken Ecke lokalisiert und wies eine starke rote Fluoreszenz im Dil-Kanal (FL-2) auf (siehe Abb. 13). Die Donor-Zellpopulation in der unteren rechten Ecke war durch eine hohe grüne Fluoreszenz im Calcein-Kanal (FL-1) gekennzeichnet. Eine Zellkopplung zwischen beiden Populationen, also ein Fluß von Calcein von den Donor- zu den Akzeptorzellen, war am Shift der Akzeptorzell-Population in Richtung Grün-Fluoreszenz (FL-1) zu erkennen. Da das Calcein-Emissionsspektrum mit dem des Di-Spektrums überlappt, wird auch Calcein-Fluoreszenz im Dil-Kanal detektiert. Daher ist die Akzeptorzell-Population im *dot plot* diagonal orientiert. Die Prozentzahl der Calcein positiven, kommunizierenden Akzeptorzellen wurde im Vergleich zur Negativkontrolle, Dil gefärbte Akzeptorzellen in der Abwesenheit von Donorzellen, ermittelt. Eine Mischung von Calcein gefärbten, Dil gefärbten und ungefärbten Zellen wurde eingesetzt, um den Signal-Nachweis zu optimieren und die Überlappung der Calcein-Fluoreszenz mit dem Dil-Kanal zu kompensieren. Die Stärke der Kopplung konnte durch die Berechnung der Anzahl an Akzeptorzellen mit Calcein-Fluoreszenz (kommunizierende Akzeptorzellen) im Verhältnis zur Gesamtzahl an Akzeptorzellen quantifiziert werden.

3.5 Histologie

3.5.1 Herstellung, Fixierung und HE-Färbung von Präparaten

Für die Histologie wurden von den in Tissue Tek (Sakura O.C.T.™ Compound) eingebetteten und über flüssigem Stickstoff eingefrorenen Tumorgewebe und humanen Gewebeproben (Plazenten) mit einem Gefriermikrotom (Kyrostat 1720, Leitz) 7 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Kryostatschnitte wurden 30 min bei RT getrocknet und anschließend mit eiskaltem 96% Ethanol für 10 min fixiert.

Für die Paraffin- und Technovit- (kaltpolymerisierender Kunststoff, Kulzer Histo-Technik) Einbettung wurden die Tumore in 4% Formalin für 24 h fixiert, in PBS für 24 h gewaschen und in 70% Ethanol bis zur Einbettung aufbewahrt. Die Einbettung in Paraffin erfolgte mit einem Shandon-Einbettautomaten. Die Technovit-Einbettung verlief nach den Angaben des Herstellers.

Es wurden 7 µm Schnitte von den in Paraffin und in Technovit eingebetteten Tumoren hergestellt. An den Kryostat-, Paraffin- und Technovitschnitten wurden HE- (Hämatoxylin-Eosin) Färbungen durchgeführt.

3.6 Immunhistochemie

3.6.1 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-Cx43	polyklonales affinitätsgereinigtes Antiserum aus Kaninchen gegen den C-Terminus von Cx43, Verdünnung 1:500 (Traub et al., 1994), (freundlicherweise von O. Traub, Bonn, zur Verfügung gestellt)
Anti-Cx43	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den C-Terminus von Cx43 (Zymed), Verdünnung 1:100
Anti-Cx43-NT1	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den N-Terminus von Cx43, Verdünnung 1:100, (erworben von Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, über P. Lampe)
Anti-Cx40	polyklonales affinitätsgereinigtes Antiserum aus Kaninchen gegen den C-Terminus von Cx40, Verdünnung 1:100 (Traub et al., 1994), (von O. Traub, Bonn, zur Verfügung gestellt)
Anti-Cx26	polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen den C-Terminus von Cx26, Verdünnung 1:300 (Traub et al., 1989), (von O. Traub, Bonn, zur Verfügung gestellt)
Anti-NOV	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, Verdünnung 1:50 (Ellis et al., 2000), (NOV-L59; von P. D. Ellis, Cambridge, UK, zur Verfügung gestellt); polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, Verdünnung 1:100 (Chevalier et al., 1998), (NOV-K51; von B. Perbal, Paris, Frankreich, zur Verfügung gestellt)
Anti-Occludin	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Zymed), Verdünnung 1:125
Anti-ZO-1	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Zymed), Verdünnung 1:200
Anti-Human-Cytokeratin	monoklonaler Antikörper aus Maus (Dako), Verdünnung 1:100
Anti-Maus-PAN	monoklonaler Antikörper aus Ratte (Pharmingen), Verdünnung 1:100
Anti-Human- β_4 -Integrin	monoklonaler Antikörper aus Ratte (Pharmingen), Verdünnung 1:500
Anti-Human- α_6 -Integrin	monoklonaler Antikörper aus Ratte (Chemicon), Verdünnung 1:50
Anti-Human- α_1 -Integrin	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Chemicon), Verdünnung 1:50
Anti-Human-EGF-Rezeptor	monoklonaler Antikörper aus Maus (Dako), Verdünnung 1:5

Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG, FITC-markiert (polyklonales Antiserum aus Schwein, 1:40, Dako)
 Anti-Maus-IgG, FITC-markiert (polyklonales Antiserum aus Kaninchen, 1:40, Dako)
 Anti-Maus-IgG, FITC-markiert (polyklonales Antiserum aus Ziege, 1:40, Dako)
 Anti-Ratte-IgG, FITC-markiert (polyklonales Antiserum aus Kaninchen, 1:200, Dako)
 Cy3-Anti-Kaninchen, Cy3-markiert (polyklonales Antiserum aus Ziege, 1:300, Dianova)
 Anti-Ratte-IgG, biotinyliert (polyklonales Antiserum aus Kaninchen, 1:400, Dako)

Anti-Maus-IgG, biotinyliert (polyklonales Antiserum aus Kaninchen, 1:200, Vectastain, Vector Laboratories)

3.6.2 Indirekte immunhistochemische Nachweisverfahren

Es wurden in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Antigen zwei unterschiedliche indirekte Nachweisverfahren angewendet, die StreptAvidin-Biotin-Färbung und die Fluoreszenzmarkierung. Bei der indirekten Immunhistochemie bindet der Primärantikörper an das Antigen. Zur Lokalisation des Antigen-Antikörper-Komplexes wird ein zweiter Antikörper eingesetzt, der gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem Enzym oder mit Biotin konjugiert ist. Durch Anregung mit Licht spezifischer Wellenlänge (Fluoreszenzfarbstoff) oder durch eine chromogene Reaktion wird der Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht.

3.6.2.1 Indirekte Immunhistochemie mit Fluoreszenzmarkierung

Für Zellkulturpräparate wurden die Zellen auf Deckgläschen (Cover-Slips, Ø 15 mm) ausplattiert und bis zur Semikonfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit Moscona-Lösung gewaschen und für 10 min in Methanol-Aceton 1:1 bei RT fixiert.

Die fixierten Kryostatschnitte bzw. Zellkulturpräparate wurden zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und dann 10 min mit 0,5% PBS/BSA-Lösung behandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dann erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper für 1,5 h bei RT oder üN bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA-Lösung wurden die Zellen/Gewebe 45 min bei RT unter Lichtausschluß mit dem zweiten FITC- oder Cy3-konjugierten Antikörper inkubiert. Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit PBS/BSA unter Lichtausschluß wurden die Präparate kurz mit Aqua bidest gespült, mit Vectashield eingedeckt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Ein Präparat diente jeweils als Negativkontrolle. Hier wurde der Primärantikörper durch PBS/BSA-Lösung ersetzt und das Präparat nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Zur Auswertung wurde ein Axiophot mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung (Zeiss) oder ein Konfokales Laserscan-Mikroskop (LSM 510, Zeiss) verwendet.

Bei Doppelinkubationen mit zwei verschiedenen Primärantikörpern wurden die Inkubationen nacheinander durchgeführt. Es wurde dabei ein FITC- und ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Die beiden Primärantikörper wurden so gewählt, daß Kreuzreaktionen ausgeschlossen wurden, indem ein poly- und ein monoklonaler Antikörper eingesetzt und Negativkontrollen ohne einen der Primärantikörper durchgeführt wurden.

3.6.2.2 Indirekte Immunhistochemie mit StreptAvidin-Biotin-Färbung

Dieser immunhistochemische Nachweis wurde an Kryostat- und Paraffinschnitten angewendet.

Bei dieser Methode bindet der Primärantikörper an das nachzuweisende Antigen (1. Schritt). Im 2. Schritt bindet der biotinylierte Sekundärantikörper als Brückenantikörper. An diesen Brückenantikörper bindet Streptavidin, das eine hohe Affinität zu Biotin besitzt, und der Meerrettich-Peroxidase (3. Schritt). Die Peroxidase bildet mit Wasserstoffperoxid bei Anwesenheit des Elektronendonors DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) einen Komplex, der anschließend zu Wasser und atomarem Sauerstoff zerfällt. Durch Oxidation des DAB entsteht ein braunes Reaktionsprodukt.

Paraffinschnitte mußten zunächst 2 x 5 min in einem Histo-clearbad (Shandon), dann in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, 1 min; 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua bidest, jeweils 3 min) entparaffiniert und mit PBS gewaschen (5 min) werden.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bis zum Waschen mit PBS/BSA nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper, wie es für die Fluoreszenz-Technik beschrieben wurde. Die einzige Ausnahme war die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit 3% H₂O₂ nach dem ersten Waschschrift mit PBS/BSA. Danach wurden die Präparate für 30 min bei RT mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA

erfolgte die Inkubation für 30 min mit dem StreptAvidin-Peroxidase-Komplex (StreptABComplex/HRP). Danach wurde die Substrat-Chromogen-Lösung aus H_2O_2 und DAB zugegeben. Die Schnitte wurden mit Aqua bidest gespült, durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70% - 96% - Isopropanol) geführt, in HistoClear gewaschen und mit Histomount (Shandon) eingedeckt.

3.7 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Nacktmäuse (Han:NMRI nu/nu) aus der Zucht des zentralen Tierlabors des Universitätsklinikum Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Milizer verwendet. Die Nacktmäuse wurden in einem keimfreien Umfeld unter kontrollierten Umweltbedingungen mit einem Tag- / Nacht-Rhythmus von 12 h gehalten. Futter, Einstreu und Käfige wurden autoklaviert. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere in einem Alter von drei Wochen bis 2 Monaten. Die Tierversuche wurden mit behördlicher Erlaubnis durchgeführt (TSG-Nr. G 588/00).

3.7.1 Tumorwachstum in Nacktmäusen

Um das Proliferations- und Invasionsverhalten von mit verschiedenen Connexin-Genen transfizierten Jeg3-Zellen zu vergleichen, wurden je $2,5 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 200 μ l isotoner NaCl-Lösung subkutan in die Flanke von Nacktmäusen injiziert. Es wurden ungefähr 6 bis 14 Tiere pro mindestens zwei verschiedener Zellklone eines Vektorkonstrukts eingesetzt. Jedem Versuchstier wurde zum direkten Vergleich die mit dem Leervektor transfizierten Zellen (Vektorkontrolle) in die linke und die jeweilige Connexin-Transfektante in die rechte Flanke inokuliert. Die Induktion der Connexin-Expression in den mit den Dox-induzierten Tet-Transfektanten (mindestens 48 h Dox-Gabe *in vitro* vor der Injektion) injizierten Mäusen wurde durch die Gabe von Doxzyklin im Trinkwasser (200 μ g/ml Dox in 3 % Saccharose-Lösung; unter Lichtausschluß in Alufolie) beibehalten. Zusätzlich wurde im Abstand von drei Tagen 1 mg Dox/Maus in isotoner NaCl-Lösung subkutan appliziert. Parallel wurden auch Tiere mit dem gleichen aber uninduzierten Tet-Zellklon injiziert. Diese Tiere enthielten nur 3 %ige Saccharose-Lösung als Trinkwasser. Das Trinkwasser der Mäuse wurde alle 3 Tage gewechselt. Das Tumorwachstum der Tiere wurde über einen Zeitraum von ungefähr 3 Wochen (17-23 Tage) je nach Tumorwachstum beobachtet und die Tumorgöße jeden 2./3. Tag mit einem Lineal in zwei Dimensionen ermittelt. Das Tumolvolumen wurde unter Annahme einer Kugelform mit Hilfe der Gleichung $V = 4/3 (\pi) \times 2a \times b$ bestimmt und die Wachstumskurven der Tumore graphisch dargestellt. Die Tiere wurden nach ungefähr 3 Wochen durch zervikale Dislokation getötet, die Tumore herauspräpariert und auf ihre Connexin-Expression mittels Immunhistochemie an Kryostatschnitten und Northern-Blot analysiert. Die Morphologie der Tumore wurde anhand von Paraffin- und Technovitschnitten mit HE-Färbungen untersucht. Zudem wurde an Kryostatschnitten mit immunhistochemischen Färbungen die Expression von Cytokeratin, PAN und Integrinen und an Paraffinschnitten die Expression des EGF-Rezeptors analysiert.

3.8 Statistische Auswertungen

Die Signifikanz ($p < 0,05$) der mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR ermittelten Expressionsunterschiede, der Unterschiede in den Proliferationsstudien *in vitro* sowie in den Tumorwachstumsanalysen wurde mit dem gepaarten und ungepaarten Student's T-Test mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2000 ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der generierten Connexin-Zelltransfektanten

Um den Einfluß verschiedener Connexin-Kanäle auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der humanen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 zu analysieren, sollten mit Connexin-Genen stabil transfizierte Zelltransfektanten hergestellt werden. Vorarbeiten mit stabil Cx-transfizierten Jeg3-Zellen, in denen die Connexin-Gene unter der Kontrolle von konstitutiven viralen Promotoren (CMV-, RSV- und SV40-Promotor) standen, zeigten nach subkutaner Injektion in die Nacktmaus ein Abschalten (*Silencing*) der Connexin-Gene. Für weitere *in vivo*-Versuche waren diese Transfektanten somit ungeeignet (Hellmann et al., 1999; Winterhager et al., 1999). Gegenstand dieser Arbeit war es, mit Hilfe neuer Vektorsysteme stabil transfizierte Cx-Transfektanten zu etablieren. Dazu wurden zwei verschiedene Strategien angewendet.

Da Chorionkarzinome sowie Jeg3- und Trophoblastzellen hCG, humanes Choriongonadotropin, produzieren, sollte ein eukaryontischer, gewebespezifischer konstitutiver α hCG-Promotor eine stabile Expression der Connexin-Gene gewährleisten.

Die zweite Strategie beruhte auf der Etablierung eines induzierbaren Tetrazyklin-Systems (Tet-System).

4.1.1 Etablierung einer induzierbaren Connexin-Genexpression in Jeg3-Zellen mit dem Tet-On-System

Das Tet-System wurde von Gossen und Bujard (1992) eingeführt. Es ermöglicht eine strenge Regulation des untersuchten Gens durch ein gezieltes An- und Abschalten über Doxyzyklin (Dox) und somit eine Kontrolle der Genexpression. Das Tet-On-System besteht aus zwei Komponenten, einem Regulator- und einem Antwort-Plasmid (Abb. 5). Das Regulator-Plasmid enthält den Tetrazyklin ansprechenden reversen transkriptionalen Transaktivator (rtTA). Er besteht aus einem Fusionsprotein aus dem reversen Tet-Repressor (rtetR) und der VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus (HSV). Das Antwort-Plasmid enthält die zu exprimierende cDNA. Diese steht unter der Kontrolle des Tetrazyklin ansprechenden Elementes (TRE). Das TRE ist aus einem Promotorkonstrukt aus 7 Kopien der Tet-Operator-Sequenzen (tetO), die dem *minimal immediate early* Promotor des humanen Cytomegalovirus (P_{minCMV}) vorgeschaltet sind, zusammengesetzt. Als Effektormolekül wurde Doxyzyklin, ein Tetrazyklin-Analogon, eingesetzt, da der reverse Transaktivator 100 mal sensitiver auf Doxyzyklin als auf Tetrazyklin anspricht (Gossen und Bujard, 1992). In der Abwesenheit des Effektors Dox erkennt der Transaktivator seine spezifische DNA-Zielsequenz (tetO) nicht und das gewünschte Gen wird nicht exprimiert. Bei der Gabe von

Dox bindet rtTA an die Tet-Operator-Sequenzen und es kommt somit zu einer Aktivierung der Genexpression (vgl. Abb. 5).

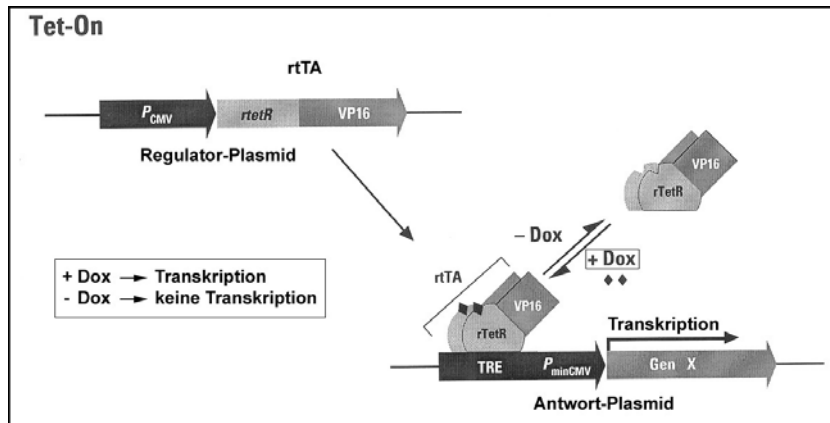


Abb. 5: Schema der Genregulation über das Tet-On-System. Weitere Erklärungen im Text. Gen X: Zielgen (aus Tet-Off™ and Tet-On™ Gene Expression Systems, User manual, PT-3001-1, Clontech, modifiziert).

In dieser Arbeit wurde das Tet-On-System verwendet, um die Expression der Connexine gezielt an- und abzuschalten und unter definierten Bedingungen die Auswirkung der Expression verschiedener Connexin-Kanäle auf die Zellphysiologie zu untersuchen.

Nach der Generierung verschiedener Tet-induzierbarer Cx-Expressionsvektoren für Cx43, Cx40, Cx26 sowie trunkiertes Cx43 (Cx43 ohne große Bereiche des C-Terminus; trCx43) wurden stabile Zelltransfektanten hergestellt. Das trunkierte Cx43-Konstrukt, in dem die Cx43-cDNA so mutiert wurde, daß die letzten 125 C-terminalen Aminosäuren fehlen (Gesamtlänge des C-Terminus: 155 Aminosäuren), wurde eingesetzt, um den Einfluß des C-Terminus zu untersuchen. Dabei bleibt der Cx43-Kanal hinsichtlich des Austausches von Molekülen funktionsfähig, jedoch ist die Regulation über ein Öffnen und Schließen der Kanäle (*Gating*) stark beeinträchtigt (Maass, persönliche Mitteilung).

Für die Etablierung der Jeg3-Tet-Transfektanten mußten zunächst zwei Transfektionen nacheinander durchgeführt werden. Zuerst wurden die parentalen Jeg3-Zellen mit dem reversen Transaktivator exprimierenden Regulator-Plasmid pUHD172-1neo, das eine G418-Resistenz vermittelt, transfiziert. Nach Selektion mittels G418 konnten mit rtTA stabil transfizierte Jeg3-Zellen erhalten werden. 35 Klone wurden auf ihre Expression der rtTA-RNA mittels der RT-PCR-Analyse untersucht (Abb. 6A). Rund ein Drittel der analysierten Klone zeigte eine Expression des reversen Transaktivators. 3 Klone mit einer starken Expression des rtTA (JpUHD18, 22 und 33) wurden ausgewählt und deren Ansprechbarkeit auf Dox mittels einer transienten Transfektion mit dem Plasmid pUHC13-3, einem rtTA-abhängigen Tet-kontrollierten Luziferase codierenden Kontrollvektor, analysiert. Hierbei bindet rtTA in der Anwesenheit von Dox an die Tet-Operator-Sequenzen im Tet-Promotor des Plasmids pUHC13-3 und aktiviert dadurch die Expression des Luziferase-Gens. Die Abwesenheit von Dox führt dagegen zu keiner oder nur schwachen Aktivierung der Transkription. Dafür wurden die Zellklone nach der Transfektion jeweils mit und ohne 1 µg/ml

Dox für 48 h kultiviert. Dann wurden die Zellen geerntet und im Luziferase-Assay untersucht. Die Auswertung des Luziferase-Assays ergab für den Klon JpUHD18 eine 2fache, für JpUHD33 eine 7fache und für JpUHD22 eine 25fache Hochregulation der Luziferase-Aktivität nach Dox-Gabe in drei unabhängigen Messungen (Abb. 6B). Da der Zellklon JpUHD22 die stärkste Hochregulation nach Dox-Gabe (-eine >20fache Regulation wird empfohlen-) mit geringer Aktivität im uninduzierten Zustand aufwies, wurde dieser für die weiteren Transfektionen mit den Tet-Cx-Expressionsvektoren ausgewählt. Hierfür wurde eine Kotransfektion mit einem Puromycin-Selektionsplasmid durchgeführt und Puromycin resistente Zellklone isoliert.

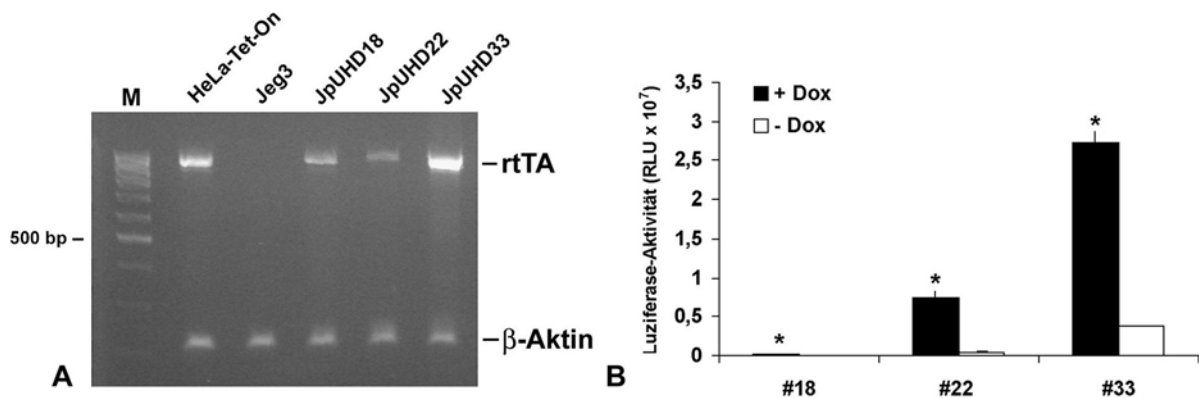


Abb. 6: (A) RT-PCR-Analyse der rtTA-Expression in pUHD172-1neo-transfizierten Jeg3-Zellen. Dargestellt ist die rtTA-Expression der Klone JpUHD18, 22 und 33 nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte (Fragmentgröße: 969 bp). Kontrolle: HeLa-Tet-On- und Jeg3-Zellen. Das Signal des β -Aktins diene als interne Kontrolle. M = 100 bp DNA-Leiter. **(B) Luziferase-Aktivität der Zellklone JpUHD18, 22 und 33 mit und ohne 48 h Dox-Induktion der Luziferase-Genexpression nach transients Transfektion mit pUHC13-3.** Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Dox-behandelten (+ Dox) und unbehandelten Zellklonen (- Dox).

Zur Analyse zellspezifischer Unterschiede wurde im Vergleich zu den Chorionkarzinomzellen als Kontrollzelllinie die käuflich erworbene HeLa-Tet-On-Zelllinie eingesetzt. Dabei handelt es sich um humane Zervixkarzinomzellen, die den reversen Transaktivator (rtTA) bereits konstitutiv exprimieren und deshalb nur noch mit den Tet-Cx-Expressionsvektoren transfiziert werden mußten. Auch hier erfolgte die Selektion über Puromycin.

Auf der Grundlage des Tet-Systems wurden jeweils 40-50 resistente Jeg3- und HeLa-Zellklone je transfiziertem Connexin-Gen (Jeg3-Zellen: Cx43, Cx40, Cx26, trCx43 und HeLa-Zellen: Cx43, Cx40 und Cx26) isoliert und auf ihre induzierbare Connexin-Expression hin untersucht.

4.1.2 Generierung von Jeg3-Cx-Transfektanten mit dem zellspezifischen α hCG-Promotor

Nach der Generierung von α hCG-Cx-Expressionsvektoren für Cx43, Cx40 und Cx26 wurden die Jeg3-Zellen jeweils mit diesen Vektoren zusammen mit einem G418-Resistenzplasmid (pBK-RSV) kotransfiziert. Es konnten bei den drei getesteten Cx-Vektoren nur sehr wenige stabile Klone nach Selektion über G418 erhalten werden. Insgesamt wurden ca. 80 Klone auf ihre Connexin-Expression hin untersucht. Um die Ausbeute an stabil transfizierten Zellen zu erhöhen, wurden dabei neben verschiedenen Transfektionsreagenzien auch verschiedene Selektionsmarker, neben G418 auch Puromycin, getestet.

Für jedes der beiden beschriebenen Systeme wurden als Negativkontrolle Zellen mit dem entsprechenden Leervektor (Vektor ohne Cx-Insert) und dem Resistenzplasmid als Vektorkontrolle transfiziert, um zellphysiologische Veränderungen, die durch den Transfektionsprozeß entstehen könnten, zu kontrollieren.

4.1.3 Nachweis der Connexin-Expression in Connexin-Transfektanten

Nach der Isolierung resistenter Zelltransfektanten wurden diese zunächst auf ihre Connexin-mRNA-Expression in der Northern-Blot-Analyse überprüft. Hier erfolgte der Nachweis der Cx-Transkripte durch die Hybridisierung mit Cx-spezifischen cDNA-Sonden an Gesamt-RNA der Zelllinien. Als Kontrollen wurde RNA aus Geweben isoliert, in denen die Expression der entsprechenden Connexine bereits beschrieben wurde (Herz: Cx43 und Cx40, Leber: Cx26). Ferner wurde die Connexin-Expression der Transfektanten auch auf der Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Untersuchungen mit Cx-spezifischen Antikörpern untersucht. Nicht nur die Expression der Connexin-Proteine sondern auch deren Lokalisation spielt beim Aufbau von funktionellen Gap Junction-Kanälen eine wichtige Rolle (vgl. 1.1.1).

Wie bereits bekannt ist, exprimiert die humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 keine Connexin-Proteine und erweist sich sowohl mittels Farbstoffinjektion als auch mit Hilfe des sensitiveren Ca^{2+} -*Imaging* als kopplungsdefizient (Hellmann et al., 1996). Nur sehr geringe Mengen von Cx40-mRNA waren mittels RT-PCR nachzuweisen. Daher eignete sich diese Zelllinie um die Rolle verschiedener Connexin-Gene zu untersuchen. Die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa wird in der Literatur ebenfalls als kommunikationsdefizient beschrieben (Elfgang et al., 1995; Mesnil et al., 1995).

4.1.3.1 Induzierbare Connexin-Expression in Tet-Transfektanten

Die Cx-Expression in den Tet-Transfektanten wurde nach Gabe von 1 µg/ml Dox in das Kulturmedium nach 48 h analysiert. 20-75% der etablierten Jeg3- und HeLa-Zellklone zeigten eine Induktion der Connexin-Expression nach Dox-Gabe. Dabei waren zelllinien- und connexinspezifische Unterschiede zu erkennen. Bei den HeLa-Zellen zeigten ungefähr 40-75% der Transfektanten eine Cx-Expression nach Behandlung mit Dox, während die Jeg3-Zellen eine geringere Rate mit 20-40% aufwiesen. Die Ausbeute an mit Cx26 stabil transfizierten Jeg3-Zellen (n=10) war am geringsten, gefolgt von trCx43 (n=12) und Cx40 (n=14). Die größte Anzahl an stabilen Zellklonen bei den Jeg3-Zellen ließ sich mit dem Cx43-Expressionsvektor erzielen (n=20). Die HeLa-Zellen konnten mit annähernd gleicher Effizienz sowohl mit Cx43 und Cx40 als auch mit Cx26 transfiziert werden.

Bei jeweils 5-10 der getesteten Klone konnte eine gute Induzierbarkeit mit einer starken, homogenen Expression der Connexine nach Dox-Behandlung gegenüber keiner oder aber sehr geringen Expression im uninduzierten Zustand beobachtet werden. Es wurden jeweils zwei bis drei Klone pro Connexin mit dem stärksten und homogensten Expressionsmuster und einer guten Regulierbarkeit über Dox für die weiteren Versuche ausgewählt.

Induzierbare Connexin-mRNA-Expression in Tet-Transfektanten

In Abbildung 7 sind die Northern-Blot-Analysen der Connexin-Expression der ausgewählten **Jeg3-Tet-Transfektanten** mit und ohne 1 µg/ml Dox-Behandlung für 48 h dargestellt.

Die Analyse der Cx-mRNA-Expression in den drei **Tet/Cx43-Transfektanten** #48, #20 und #36 zeigte nach Induktion von Cx43 durch die Gabe von Dox unterschiedlich starke Cx43-Signale (1,8 kb Transkriptgröße), die auf den Nachweis der exogenen Ratten-Cx43-cDNA zurückzuführen sind (Abb. 7A). Im Klon #48 konnte die stärkste exogene Cx43-Bande im Vergleich zur mäßig starken Expression in den Klonen #36 und #20 nachgewiesen werden. Dies wurde auch in der dargestellten densitometrischen Analyse der RNA-Transkripte deutlich (Abb. 7B). Hierzu wurde die Expression der Connexin-Gene gegen die des GAPDH, einem konstitutiv exprimierten Gen, abgeglichen, quantifiziert und graphisch dargestellt. Dagegen wiesen die uninduzierten Zellklone keine Cx43-Expression auf. Auch in der Vektorkontrolle und in den parentalen Jeg3-Zellen konnten keine Cx43-Transkripte detektiert werden. Herzgewebe als Positivkontrolle für Cx43 zeigte das endogene Signal bei 3,0 kb (Abb. 7A).

In den **Tet/Cx40-Transfektanten** wurde eine durch Dox-induzierte Cx40-mRNA-Expression (1,3 kb-Bande) in den drei Zellklonen (#19, #9 und #13) verglichen mit dem uninduzierten Zustand detektiert (Abb. 7C, D). Die Vektorkontrolle und die Jeg3-Zellen wiesen wie erwartet keine Cx40-Signale auf. Die Positivkontrolle Herzgewebe zeigte die endogene Cx40-Bande

bei 3,3 kb. Klon #13 wies die geringste Cx40-Expressionsstärke im Vergleich zu den Klonen #19 und #9 auf.

In Abbildung 7E und F ist das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse der **Tet/Cx26-Transfektanten** (#9 und #5) dargestellt. Auch hier zeigten die zwei Klone nach Dox-Induktion ein starkes exogenes Cx26-Signal (1,5 kb) gegenüber den uninduzierten Zellklonen (mit schwachen Cx26-Signalen, vgl. Abb. 7F) und den Kontrollen (Vektorkontrolle und parentale Jeg3-Zellen). Klon #5 wies das stärkste exogene Cx26-Signal auf. Als Positivkontrolle konnte im Lebergewebe das endogene Cx26-Signal bei 2,5 kb detektiert werden.

Die Cx43-mRNA-Expression in den **Tet/trCx43-Transfektanten** (#41, #37 und #16) ist in Abbildung 7G, H zu erkennen. Die drei Klone zeigten in den Dox-behandelten Zellen exogene Cx43-Signale auf einer Höhe von ca. 1 kb. Die trCx43-mRNA ist aufgrund des Verlustes des C-Terminus kleiner als die *full length* Cx43-mRNA. Von den drei dargestellten Klonen konnte im Klon #41 das stärkste Signal detektiert werden. Keine Cx43-Expression war in der Vektorkontrolle und in den Jeg3-Zellen zu erkennen.

Die Northern-Blot-Analyse der **HeLa-Tet/Cx43-Transfektanten** ist in Abbildung 8 zusammengefaßt. Die Cx43-Transfektanten wiesen unter Dox-Behandlung sehr starke exogene Cx43-Signale auf (Abb. 8A, B). Jedoch konnte auch in den uninduzierten Klonen, wie im Klon #41, exogene Cx43-mRNA nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den exogenen Cx43-Signalen in den uninduzierten Transfektanten konnte in diesen sowie in der Vektorkontrolle und in den parentalen HeLa-Zellen eine schwache endogene Cx43-Expression beobachtet werden, die in den Dox-induzierten Zellklonen #41 und #46 hochreguliert wurde. Diese Hochregulation von endogenem Connexin nach Dox-Induktion konnte in keiner der anderen Transfektanten nachgewiesen werden und scheint spezifisch für die transfizierten HeLa-Zellen zu sein. Aufgrund der endogenen Cx43-Expression war die HeLa-Tet-On-Zelllinie als Kontrollzelllinie für diese Versuche unbrauchbar und wurde für weitere Versuche nicht mehr eingesetzt.

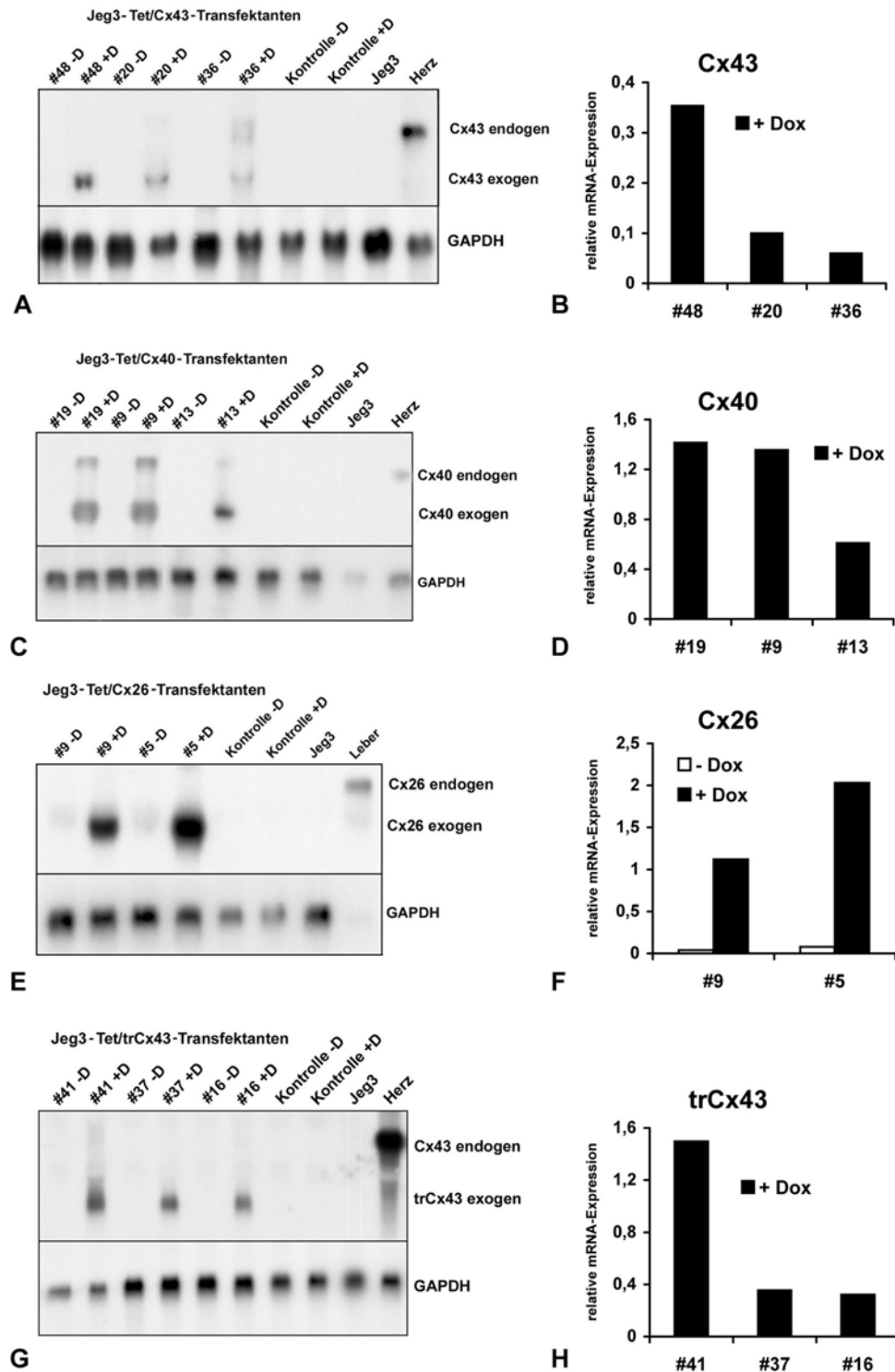


Abb. 7: Northern-Blot-Analysen der Cx-Expression in Jeg3-Tet-Transfektanten vor und nach 48 h Dox-Induktion. Aufgetragen wurden je 5 µg Gesamt-RNA. Zum Vergleich diente Gesamt-RNA von Herz- und Lebergewebe, parentalen Jeg3-Zellen, Kontrolle = Vektorkontrolle. (A, C, E, G) Northern-Blot-Hybridisierungen; (B, D, F, H) Densitometrische Auswertungen der in (A, C, E, G) gezeigten Autoradiographien zur Bestimmung der relativen Cx-Expressionsstärke durch den Abgleich gegen GAPDH. (A, B) Cx43-, (C, D) Cx40-, (E, F) Cx26- und (G, H) trCx43-Transfektanten. In allen Tet-Transfektanten war eine durch Dox-induzierbare exogene mRNA-Expression des transfizierten Connexins zu erkennen. Dagegen konnte keine oder aber eine schwache exogene Cx-Expression in den uninduzierten Zellklonen (siehe E, F, Cx26) und in den Kontrollen detektiert werden. +D: + Dox, -D: - Dox.

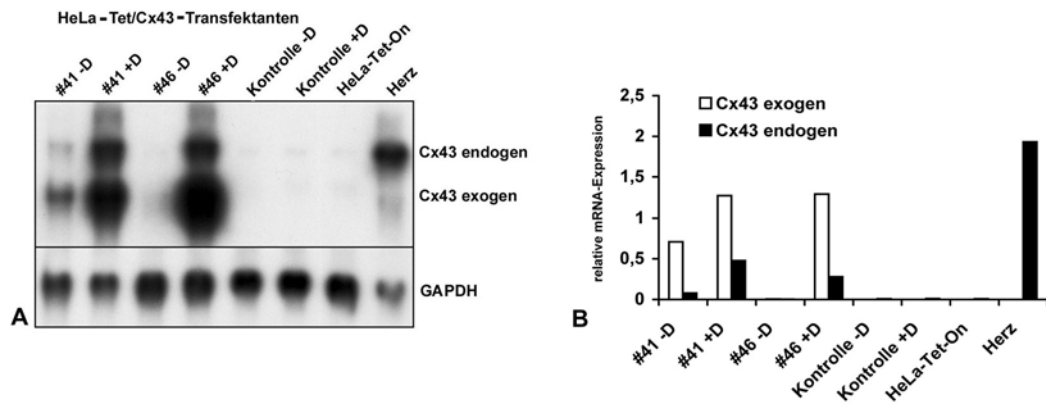


Abb. 8: (A) Northern-Blot-Analyse der Cx43-Expression in HeLa-Tet/Cx43-Transfektanten vor und nach 48 h Dox-Induktion mit densitometrischer Auswertung der relativen Cx43-Expressionsstärke **(B)** nach dem Abgleich gegen GAPDH anhand der in (A) gezeigten Autoradiographie. Aufgetragen wurden je 5 µg Gesamt-RNA. Die Klone #41 und #46 wiesen nach Dox-Induktion eine starke exogene Cx43-Expression im Vergleich zu den Kontrollen auf. Klon #41 zeigte auch im uninduzierten Zustand ein exogenes Signal. Auffällig war die Hochregulation der endogenen Cx43-Expression in den Dox-induzierten Klonen. Kontrolle = Vektorkontrolle; +D: + Dox, -D: - Dox.

Induzierbare Connexin-Protein-Expression in Tet-Transfektanten

Um die induzierbare Cx-Expression auch auf der Protein-Ebene zu untersuchen, wurden die Jeg3-Tet-Transfektanten mit und ohne Zugabe von 1 µg/ml Dox ins Kulturmedium nach 48 h immunhistochemisch analysiert.

Abbildung 9 zeigt beispielhaft den Nachweis der induzierbaren Cx43-, Cx40-, Cx26- und trCx43-Protein-Expression in stabil transfizierten Jeg3-Tet-Transfektanten. Alle Zelltransfektanten wiesen eine durch Dox-induzierbare starke Connexin-Expression entlang der lateralen Zellmembran auf (Abb. 9B, D, F, H). Ohne Dox-Gabe zeigten die Cx-Transfektanten nur eine sehr geringe bis keine Immunreaktion auf ihr transfiziertes Connexin (Abb. 9A, C, E, G). Während die Cx43-transfizierten Zellklone neben Markierungen an der Zellmembran auch sehr viele intrazytoplasmatische Lokalisationen von Cx-Proteinen aufwiesen (Abb. 9B), zeigten die Cx26-Transfektanten eine eher punktförmige Immunreaktion (Abb. 9F). Die mit Cx40-transfizierten Zellklone ließen ebenfalls feine Markierungen an der Zellmembran und intrazelluläre Plaques mit Cx40-Expression erkennen (Abb. 9D). Immunhistochemische Cx43-spezifische Färbungen an Jeg3-Zellen, die mit dem trunktierten Cx43-Konstrukt transfiziert wurden, ergaben teilweise Markierungen an der Zellmembran, aber auch intrazelluläre Lokalisationen von trCx43-Proteinen (Abb. 9H).

Die Vektorkontroll-Transfektanten sowie die parentalen Jeg3-Zellen zeigten keine Expression der Connexine (nicht dargestellt).

Die immunhistochemischen Analysen der Cx-transfizierten Jeg3-Zellklone bestätigten den Einbau der exogen exprimierten Connexine in die Zellmembran. Zudem konnte eine gute Korrelation zwischen der Stärke der Cx-mRNA-Expression der einzelnen Zellklone und der Stärke der Cx-Protein-Expression beobachtet werden (vgl. Abb. 7, 9). So war eine Auswahl

von Klonen mit einem starken homogenen Expressionsmuster und einer guten Regulierbarkeit über Dox möglich.

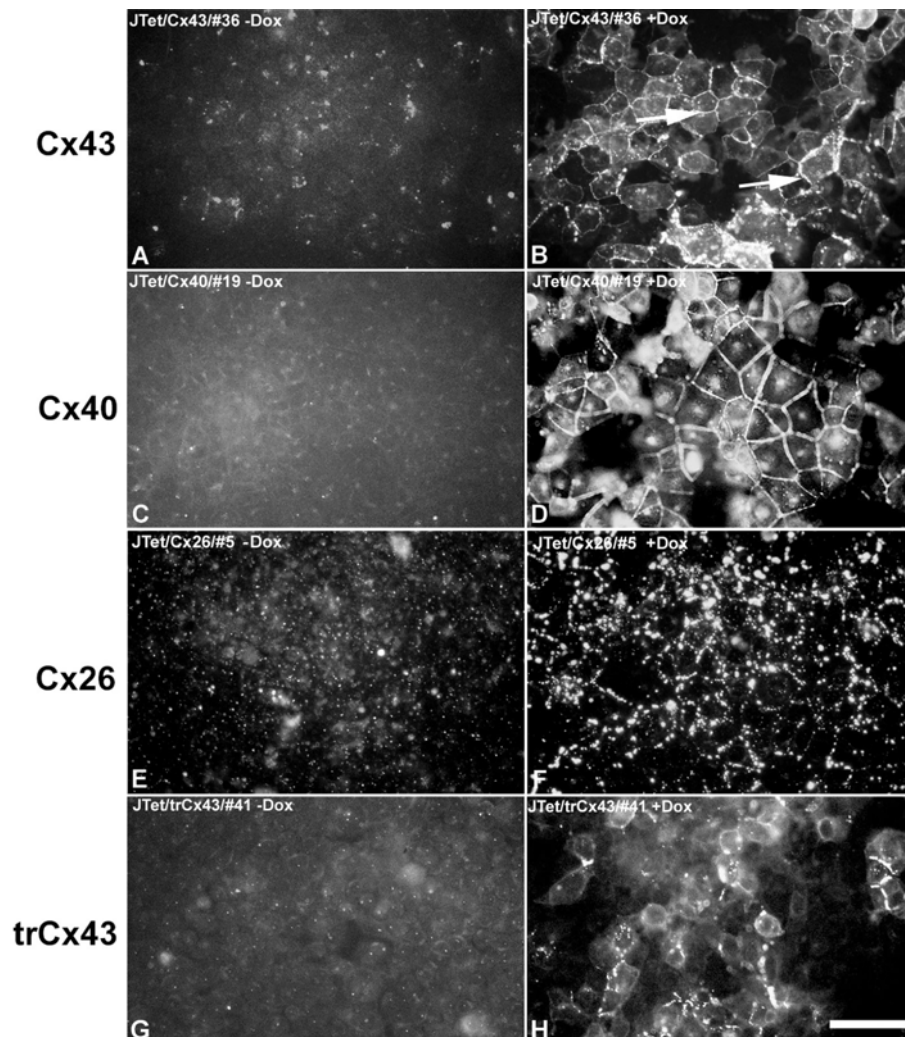


Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis von Cx43, Cx40, Cx26 und trCx43 in exemplarischen Jeg3-Tet-Transfektanten vor und nach 48 h Dox-Induktion. Fluoreszenzaufnahmen. Der dargestellte Klon Tet/Cx43/#36 zeigte eine durch Dox-induzierbare Cx43-Expression entlang der lateralen Zellmembran (B; siehe Pfeile) im Vergleich zum uninduzierten Zustand (A). Nach Dox-Induktion wiesen die Transfektanten Tet/Cx40/#19 (D), Tet/Cx26/#5 (F) und Tet/trCx43/#41 (H) ebenfalls eine Expression auf ihr entsprechendes transfiziertes Cx-Protein an der Zellmembran im Vergleich zu den uninduzierten Zellen auf (C, E, G). Zudem waren auch intrazelluläre Cx-Strukturen erkennbar (B, D, F, H). Balken: 40 µm.

4.1.3.2 Connexin-Expression in α hCG-Promotor-Transfektanten

Die Transfektion der Jeg3-Zellen mit den α hCG-Cx-Konstrukten (Cx43, Cx40 und Cx26) führte, verglichen mit den Tet-Cx-Vektoren, zu weniger befriedigenden Ergebnissen. Nach der Analyse von ca. 80 Klonen pro Cx-Konstrukt war es nicht möglich, stabil mit Cx40- und Cx26-transfizierte Zellen zu generieren. Nur einige Klone zeigten ein sehr schwaches inhomogenes Expressionsmuster, das sich aber nach längerer Kultivierung als nicht stabil erwies. Diese Klone konnten daher nicht für weitere Versuche eingesetzt werden.

Die Herstellung von Jeg3-Zellen mit dem α hCG/Cx43-Konstrukt verlief dagegen etwas erfolgreicher. Von den ca. 80 getesteten Klonen wiesen zumindest 6 Klone eine schwache und inhomogene Cx43-Expression auf, die aber nur in 2 Klonen stabil war. In Abbildung 10A ist die Northern-Blot-Analyse dieser α hCG/Cx43-Transfektanten mit und ohne cAMP-Behandlung der Zellen für 48 h dargestellt. Da sich im α hCG-Promotor zwei *cAMP response elements* befinden (Silver et al., 1987; Deutsch et al., 1987), konnte die Cx43-Expression über die Gabe von 1 mM Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) ins Kulturmedium gesteigert werden. Der Klon #2 wies ein schwaches exogenes Cx43-mRNA-Signal (1,8 kb) im Northern-Blot auf, das durch die Gabe von cAMP stark gesteigert werden konnte, während Klon #22 nur nach cAMP-Behandlung eine Cx43-Expression aufwies. Nur mit der RT-PCR-Analyse konnten Cx43-Transkripte im Klon #22 ohne cAMP-Behandlung nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Die immunhistochemische Analyse der Cx43-Expression eines α hCG/Cx43-Transfektanten ist in Abbildung 10B und C dargestellt. Der Zellklon zeigte neben einer inhomogenen Cx43-Expression an der Zellmembran auch sehr viele intrazelluläre Cx-Strukturen (Abb. 10B). Auch hier konnte eine Steigerung der Cx43-Expression über die Gabe von cAMP wie im Northern-Blot bestätigt werden (Abb. 10C).

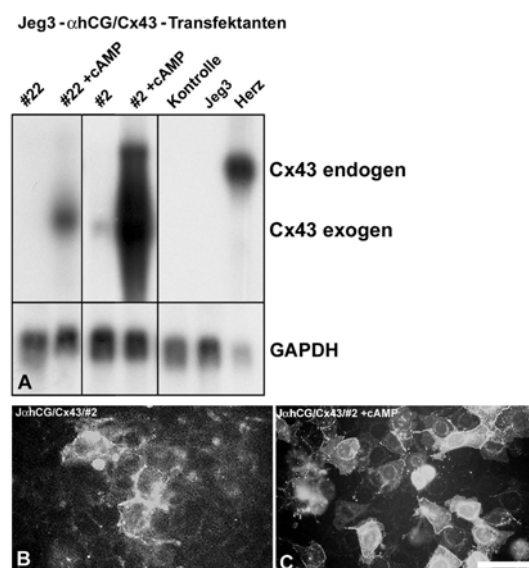


Abb. 10: Northern-Blot-Analyse (A) und immunhistochemischer Nachweis (B, C) der Cx43-Expression in Jeg3- α hCG/Cx43-Transfektanten. (A) Aufgetragen wurden je 5 μ g Gesamt-RNA. Der Klon #2 zeigte ein exogenes Cx43-mRNA-Signal, das nach cAMP-Gabe für 48 h noch verstärkt wurde, während der Klon #22 nur nach cAMP-Behandlung eine Cx43-Bande aufwies. Kein Cx43-Signal war in der Vektorkontrolle (= Kontrolle) und in den parentalen Jeg3-Zellen zu finden. Als Vergleich ist die Expression von GAPDH dargestellt. (B, C) Der immunhistochemische Nachweis von Cx43 im Klon #2 ließ eine stärkere Expression von Cx43 nach cAMP-Behandlung (C) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (B) erkennen. Balken: 40 μ m.

4.1.4 Kinetik der Connexin-Expression in Tet-Transfektanten

In weiteren Versuchen wurde die Kinetik der Induktion und Deaktivierung der Connexin-Genexpression in den Jeg3-Tet-Transfektanten auf der RNA-Ebene mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR untersucht. Dafür wurden die Zellen für die Induktionsversuche gleichmäßig in 6-well-Kulturplatten ausplattiert und bis zu einer ca. 60%igen Konfluenz kultiviert. Dann wurde die Induktion der Connexin-Expression über die Gabe von 1 μ g/ml Dox gestartet und die RNA der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 h)

geerntet. Dieser zeitliche Rahmen wurde gewählt, da eigene Versuche und Angaben aus der Literatur gezeigt haben, daß Inkubationszeiten länger als 48 h zu keiner weiteren Steigerung der Genexpression führten und nach dieser Zeit eine volle Induktion erreicht war (Gossen et al., 1995). Gleiche Versuche wurden auch zur Analyse der Deaktivierung der Connexin-Expression durch den Entzug von Dox durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit 1 µg/ml Dox für mindestens 48 h kultiviert. Dann wurde das Kulturmedium durch Dox-freies Medium nach zweimaligem Waschen mit Moscona ersetzt und die RNA nach bestimmten Zeitpunkten geerntet: 0, 2, 4, 8, 24 und 48 h. Die dosisabhängige Expression der Connexine wurde nicht weiter untersucht und eine konstante Konzentration von 1 µg/ml Dox verwendet, da diese laut Literatur in Luziferase-Assays mit verschiedenen Konzentrationen von Dox zu einer maximalen Aktivierung der Genexpression führte (Gossen et al., 1995).

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der zeitlichen Regulation der Connexin-Expression nach Induktion und Entzug von Dox nach der semiquantitativen RT-PCR-Analyse am Beispiel einer Cx43-Transfektante dargestellt. Nach 8 h Kultivierung der Zellen mit Dox war im Mittel eine 20% Induktion und nach 24 h eine 50% Induktion der Cx43-Expression erreicht (Abb. 11A, C). Nach Dox-Entzug in der gleichen Cx43-Transfektante zeigte sich schon nach 4 h im Durchschnitt eine 60%ige Reduktion der Cx43-Expression (Abb. 11B, C). Nach 24 h war nur noch eine geringe bis keine Cx43-Expression zu detektieren.

Die Analysen zur Kinetik der Connexin-Expression nach Dox-Induktion und -Entzug wurden an den drei ausgewählten Cx43-Transfektanten (vgl. Abb. 7A, B) beispielhaft durchgeführt. Grundlage der meisten Induktionsexperimente waren Zellen, die für 48 h einer Dox-Behandlung ausgesetzt wurden.

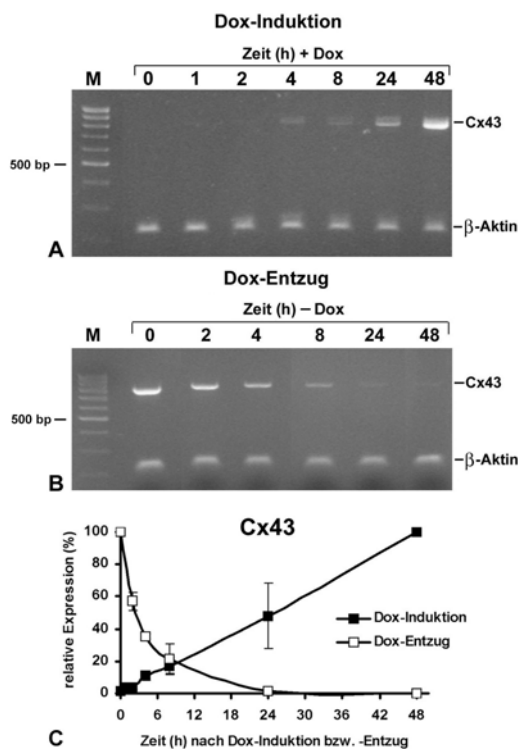


Abb. 11: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Kinetik der Cx43-Expression in einer Jeg3-Tet/Cx43-Transfektante nach Dox-Induktion und -Entzug. (A, B) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Cx43-Amplifikation (Fragmentgröße: 784 bp) nach 0, 1, 2, 4, 8, 24 und 48 h Dox-Induktion (A) und nach 0, 2, 4, 8, 24 und 48 h Dox-Entzug (B). Die Amplifikation von β -Aktin diente als interne Kontrolle. M = 100 bp DNA-Leiter. (C) Quantitative Auswertung der relativen Cx43-Expression (nach Abgleich gegen β -Aktin) des Klon Jeg3-Tet/Cx43/#36 nach Dox-Induktion und -Entzug. Es wurde der Zeitpunkt 48 h bei Induktion und 0 h beim Entzug von Dox als 100% gesetzt. Deutlich zu erkennen ist der zeitliche Verlauf der Induktion von Cx43 nach Dox-Gabe und die Abnahme der Cx43-Expression nach Entzug von Dox. Meßwerte geben die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3) an.

4.1.5 Quantitative Bestimmung der funktionellen Zellkopplung über den Farbstoff-Transfer-Assay und FACS-Analyse

Neben dem Nachweis der Expression von Connexin-mRNA und -Protein wurde die Existenz von funktionellen Gap Junction-Kanälen in den Transfektanten untersucht.

Dazu wurde die funktionelle Kopplungsfähigkeit der Jeg3-Cx-Transfektanten mit Hilfe einer Kombination aus einer Farbstoff-Beladungstechnik und der fluoreszenzaktivierten Durchflußzytometrie (FACS) analysiert und quantifiziert. Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruhte auf dem *Parachute* Assay und wurde zur Etablierung in unserem Labor leicht modifiziert (Ziambaras et al., 1998; Czyz et al., 2000). Im Gegensatz zu anderen Verfahren, wie der Injektion von Lucifer Yellow (siehe 1.1.3), konnte mit Hilfe dieser Methode eine große Anzahl an Zellen in einem Experiment analysiert werden.

Zur Ermittlung des Kopplungsgrades wurden die Donorzellen mit dem membranpermeablen Farbstoff Calcein-AM (grüne Fluoreszenz) und die Akzeptorzellen mit dem membranbindenden Farbstoff Dil (rote Fluoreszenz) gefärbt und für 4 h kokultiviert (vgl. 3.4.7; Abb. 12). Nach der intrazellulären Spaltung von Calcein-AM entsteht das fluoreszierende Calcein, welches nicht mehr membrangängig ist. Der Transfer des hydrophilen Calceins über die Gap Junction-Kanäle von den Donor- zu den Akzeptorzellen konnte als Maß für den Grad der Kopplung mit Hilfe der FACS-Analyse quantifiziert werden. Die gekoppelten Akzeptorzellen wiesen nach dem Transfer des Calceins eine orange bis gelbe Fluoreszenz auf (Abb. 12D). Es war zu erkennen, daß sich das Calcein nicht nur in die direkt benachbarten sondern auch in entferntere Zellen ausbreitete. Um die Stärke der Kopplung in der FACS-Analyse zu quantifizieren, wurde die Anzahl an Akzeptorzellen mit Calcein-Fluoreszenz im Verhältnis zur Gesamtzahl an Akzeptorzellen in % berechnet.

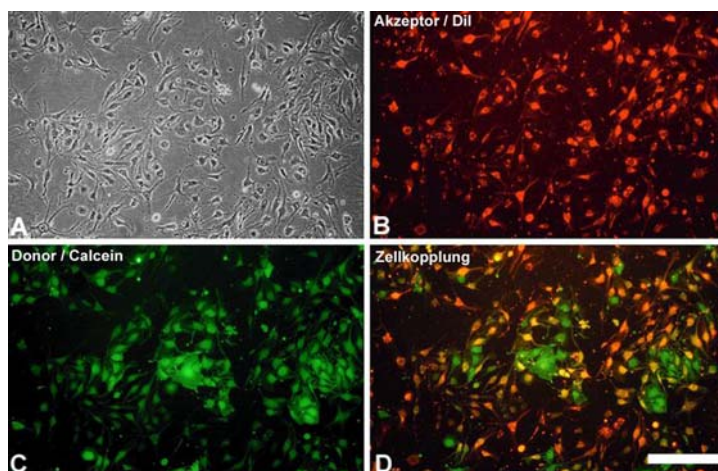


Abb. 12: Darstellung der Kopplungsanalyse mittels des Farbstoff-Transfer-Assays. Calcein-Transfer zwischen homolog koppelnden bEnd3-Endothelzellen. (A) Phasenkontrastaufnahme; (B, C, D) Fluoreszenzaufnahmen. Für die Kopplungsanalysen wurden die Akzeptorzellen mit dem membranständigen, rot fluoreszierenden Farbstoff Dil (B) und die Donorzellen mit dem Gap Junction permeablen, grün fluoreszierenden Farbstoff Calcein gefärbt (C). Die gekoppelten Akzeptorzellen waren nach dem Transfer des Calceins nach 4 h Kokultivierung orange bis gelb gefärbt (D). Balken: 150 µm.

4.1.5.1 Homologe Kopplungsanalysen der Jeg3-Cx-Transfektanten

Der verwendete Assay wurde zunächst mit Hilfe der Maus-Endothelzelllinie bEnd3 etabliert. bEnd3-Zellen weisen die für Endothelzellen *in vivo* typischen Connexine auf: Cx43 und Cx40 (Kwak et al., 2001). Aufgrund dieses Connexin-Expressionsmusters, das dem der Jeg3-Transfektanten entspricht, war diese Zelllinie als Kontrollzelllinie am besten geeignet, um die Methode auszutesten und zu etablieren.

In Abbildung 13 ist die FACS-Analyse der homologen Kopplung zwischen bEnd3-Endothelzellen anhand eines Beispiels dargestellt. Es zeigte sich ein Transfer des Calceins zwischen den bEnd3-Zellen mit 80,7% gekoppelten Zellen (Abb. 13C). Dil gefärbte Akzeptorzellen in der Abwesenheit von Calcein gefärbten Donorzellen dienten als Negativkontrolle, um die korrekte Position der nicht kommunizierenden Akzeptorzellen festzulegen (Abb. 13B). Diese waren durch eine hohe Intensität an roter Fluoreszenz (FL-2) gekennzeichnet. Gekoppelte Zellen waren am Shift der Dil gefärbten Akzeptorzellen in Richtung Grün-Fluoreszenz (FL-1) zu erkennen (Abb. 13C). Die bEnd3-Zellen zeigten einen homologen Kopplungsgrad von $84 \pm 5,9\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n=4$).

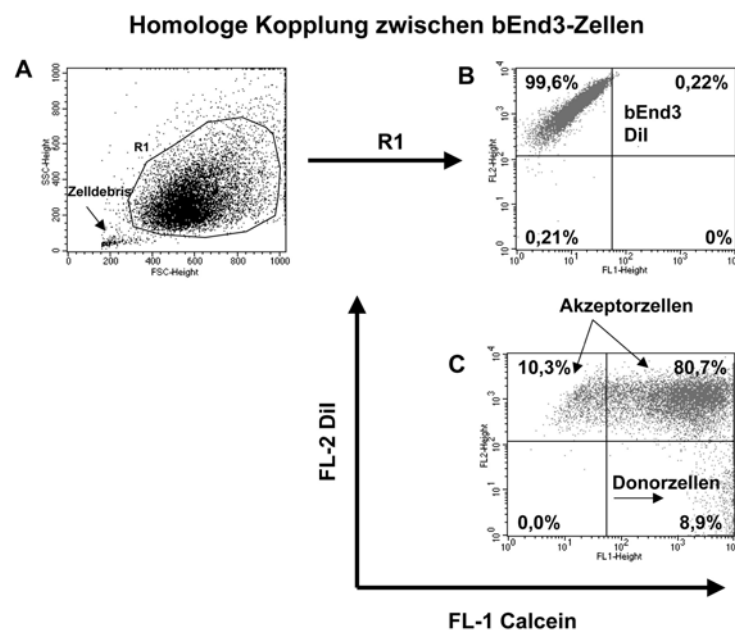


Abb. 13: Beispiel einer FACS-Analyse des Calcein-Transfers. Homologe Kopplung zwischen bEnd3-Endothelzellen. bEnd3-Akzeptorzellen wurden mit Dil beladen und mit Calcein gefärbten bEnd3-Donorzellen für 4 h kokultiviert (näheres siehe 3.4.7). **(A)** Dot plot der gating-Strategie basierend auf Lichtstreuungs-Charakteristika, um die lebende bEnd3-Zellpopulation (R1) von toten Zellen zu trennen. **(B)** Dil gefärbte Akzeptorzellen, die durch eine hohe Intensität an roter Fluoreszenz (FL-2) gekennzeichnet sind, in der Abwesenheit von Calcein gefärbten Donorzellen als Negativkontrolle, um die Position der nicht kommunizierenden Akzeptorzellen festzulegen. Die Prozentzahl der Zellen ist in jedem der vier Quadranten des dot plots angegeben. Die Y-Achse repräsentiert die Dil (FL-2)- und die X-Achse die Calcein (FL-1)-Fluoreszenzintensität. **(C)** Ein Calcein-Transfer zwischen Donor- und Akzeptorzellen ist am Shift der Dil gefärbten Akzeptorzellen in Richtung Grün-Fluoreszenz (FL-1) zu erkennen. Die Anzahl der gekoppelten Dil/Calcein positiven bEnd3-Zellen beträgt 80,7% (rechter oberer Quadrant). Die Calcein gefärbten Donorzellen (8,9%) befinden sich in der rechten unteren Ecke des dot plots mit einer hohen grünen Fluoreszenz (FL-1).

Die homologen Kopplungseigenschaften der Jeg3-Tet/Cx43-Transfektanten wurden jeweils vor und 48 h nach Dox-Induktion untersucht (Abb. 14A-C). In der Abbildung 14A, B ist beispielhaft eine FACS-Analyse eines Cx43-Transfektanten mit und ohne Dox-Kultivierung dargestellt. Nach 48 h Dox-Gabe konnte eine deutliche Kopplung zwischen den Zellen der Cx43-Transfektante (Abb. 14B) im Vergleich zu den uninduzierten Zellen (Abb. 14A) beobachtet werden. Die zwei analysierten Zellklone #20 und #36 wiesen eine starke homologe Kopplung im Mittel bis zu 86% (Klon #20) nach Behandlung mit Dox im Gegensatz zum uninduzierten Zustand in vier unabhängigen Experimenten auf (Abb. 14C). Als Kontrolle wurde auch der Grad der Kopplung zwischen den Vektorkontroll-Zellen (Kontrolle) mit und ohne Dox-Gabe bestimmt. Die Vektorkontroll-Zellen zeigten keine spezifische Kopplung, sondern nur ein Hintergrund-Rauschen (+ Dox: 13,1% und - Dox: 11,2%; n=4). Die Quantifizierung der Kopplung der Cx43-Transfektanten ergab signifikante Unterschiede zwischen Dox-behandelten und unbehandelten Zellen und zu den entsprechenden Vektorkontrollen (Abb. 14C). Außerdem wurden Unterschiede in den individuellen Klonen deutlich. Klon #20 wies induziert im Mittel eine Kopplung von 86% auf, während ohne Dox-Kultivierung nur 22,5% der Zellen koppelten. Die Kopplungsrate bei Klon #36 betrug 61,1% (+ Dox) und 26% (- Dox). Die schwache Zellkopplung im uninduzierten Zellklon beruhte zum Teil auf die Reaktion des Tet-Promotors auch in der Abwesenheit von Dox. Jedoch war deutlich eine bis zu 4fach signifikante Erhöhung der Kopplung in den Cx43-Transfektanten nach Induktion mit Dox zu erkennen. Der höhere homologe Kopplungsgrad des induzierten Klon #20 gegenüber dem Klon #36 korrelierte auch mit dessen stärkerer Cx43-mRNA-Expression nach Dox-Induktion (Abb. 7A, B).

In Abbildung 14D sind die Kopplungseigenschaften von zwei Jeg3-Tet/Cx40-Transfektanten dargestellt. Die Cx40-Transfektanten wiesen gegenüber den Cx43- und Cx26-transfizierten Jeg3-Zellen geringere Kopplungsraten auf (siehe Abb. 14C, E). Der Grad der Kopplung betrug im Durchschnitt bei Klon #19 induziert 63,2% (n=2) und bei Klon #13 nur 23,7% (n=2). Bei beiden Klonen war jedoch die homologe Kopplung nach Dox-Induktion signifikant 1,5-1,7fach im Vergleich zum uninduzierten Klon und der Vektorkontrolle erhöht. Auch hier korrelierte eine stärkere Cx40-mRNA-Expression im Klon #19 verglichen mit Klon #13 nach Dox-Induktion (vgl. Abb. 7C, D) mit einer höheren Kopplungsfähigkeit.

Abbildung 14E gibt die Daten der homologen Kopplung zwischen den Jeg3-Tet/Cx26-Transfektanten wieder. Auch hier konnte eine signifikante Hochregulation in den Dox-induzierten Zellklonen detektiert werden. Die beiden Klone zeigten eine Kopplungsrate von 76-81% im induzierten Zustand mit einer 2-3fachen Erhöhung gegenüber dem uninduzierten Klon (n=4). Auffällig war, daß es bei den beiden Cx26-Klonen, im Gegensatz zu den analysierten Cx43- und Cx40-Transfektanten, keine Korrelation zwischen der Menge an Cx26-Transkripten und dem Grad der homologen Kopplung gab. Klon #5 zeigte zwar die

stärkste Cx26-Expression auf der RNA-Ebene (Abb. 7E, F), jedoch war der Kopplungsgrad der beiden Klone #5 und #9 nahezu identisch.

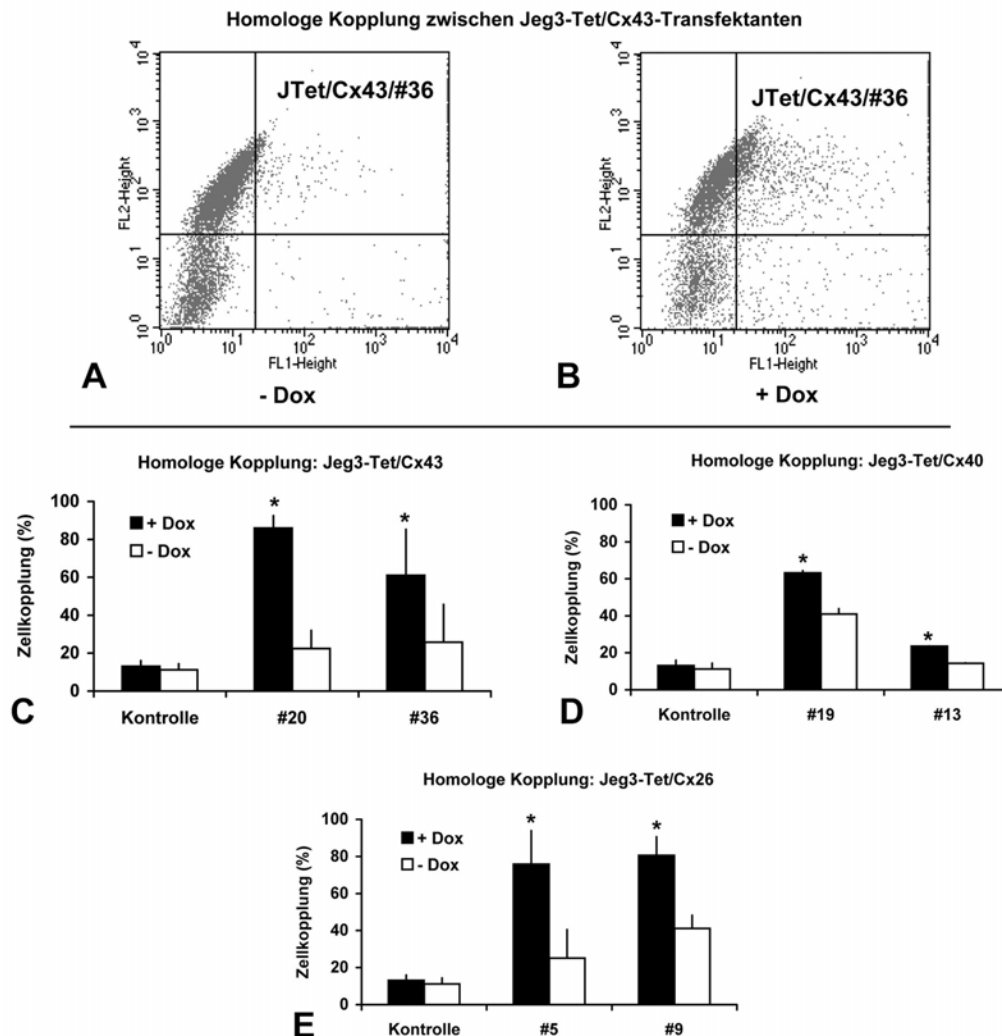


Abb. 14: Quantifizierung der homologen Kopplung der Jeg3-Tet-Transfektanten mittels FACS-Analyse vor und nach 48 h Dox-Induktion. (A, B) Beispiel einer FACS-Analyse des Calcein-Transfers der homologen Kopplung zwischen Jeg3-Tet/Cx43/#36 vor und nach Dox-Induktion. Deutlich zu erkennen ist eine starke Kopplung zwischen den Zellen nach Dox-Induktion (B) im Vergleich zu einer sehr schwachen Kopplung im uninduzierten Zustand (A). (C-E) Quantitative Auswertung der homologen Kopplung zwischen Tet/Cx43- (C), Tet/Cx40- (D) und Tet/Cx26-Transfektanten (E) im Vergleich zur Vektorkontrolle (= Kontrolle) mit und ohne Kultivierung mit Dox. Die Stärke der Zellkopplung ist in % angegeben. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. (C, E: n=4, D: n=2). * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Dox-behandelten (+ Dox) und unbehandelten Zellklonen (- Dox) und zwischen Dox-behandelten Klonen und Vektorkontroll-Zellen.

Bei der Analyse eines Jeg3-Tet/trCx43-Transfektanten konnte die Funktionalität des trunkierten Cx43-Kanals bestätigt werden. 85,5% (n=2) der Zellen des Klons #16 koppelten nach Induktion der Cx-Expression durch die Gabe von Dox (nicht gezeigt).

Die homologe Kopplung der Jeg3- α hCG/Cx43-Transfektanten konnte ebenso bestätigt werden. Klon #2 wies eine schwache Kopplung von im Mittel 23,5% (n=2) gegenüber der Vektorkontrolle (10,6%; n=2) auf (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der homologen Kopplungsanalysen der Jeg3-Cx-Transfektanten zeigten, daß die Induktion der Connexin-Expression auf RNA- und Protein-Ebene auch zu einer Erhöhung der funktionellen Kopplung führte. Der unterschiedliche Grad der Zellkopplung in den einzelnen Transfektanten korrelierte, mit Ausnahme der Cx26-Transfektanten, auch mit der Menge an Connexin-mRNA und -Protein (siehe Abb. 7 und 9) und bestätigte neben der Funktionalität der transfizierten Gap Junction-Kanäle auch die der regelbaren Connexin-Expression.

4.2 Heterologe Kopplungsanalysen

4.2.1 Analyse der Invasionseigenschaften der Jeg3-Cx-Transfektanten *in vitro*

Um die heterologe Kommunikationsfähigkeit von Tumor- und Endothelzellen zu untersuchen, wurden Kopplungsexperimente zwischen der Endothelzelllinie bEnd3 und den Jeg3-Cx-Transfektanten durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf der Analyse der Cx43- und Cx26-Transfektanten. Diese beiden Cx-Transfektanten wurden ausgewählt, weil Cx43 in Endothelzellen exprimiert wird, während Cx26 kein endothelzellspezifisches Connexin ist. Es war bereits bekannt, daß Tumorzellen eine direkte Zell-Zell-Kommunikation mit Endothelzellen herstellen können und sogenannte Mosaikgefäße aufbauen (El Sabban und Pauli, 1991, 1994-1995; Maniotis et al., 1999). Es sollte daher die Rolle verschiedener Connexine in Tumorzellen für die Integration in die Endothelzellschicht analysiert werden.

In Abbildung 15A ist das Ergebnis der FACS-Analyse des Calcein-Transfers in heterologen Kopplungsexperimenten zwischen bEnd3 und Jeg3-Tet/Cx43-Transfektanten dargestellt. Der Calcein-Fluß wurde vor und nach 48 h Induktion mit Dox gemessen. Die zwei analysierten Cx43-Klone zeigten eine heterologe Kopplung mit bEnd3-Zellen im Durchschnitt von bis zu 74,7% (Klon #36) nach Induktion von Cx43 mit Dox in vier unabhängigen Experimenten. Es konnte eine 1,4fache (Klon #20) bis 3,5fache (Klon #36) signifikante Erhöhung der Kopplungsfähigkeit im Vergleich zum uninduzierten Klon und zu den Vektorkontroll-Zellen detektiert werden. Klon #36 wies eine stärkere heterologe als homologe Kopplung auf (vgl. Abb. 14C; 61,1% homologe Kopplung). Diese Eigenschaft konnte bei den anderen Klonen nicht bestätigt werden und beruhte auf einer Spezifität des Klons und nicht auf der des transfizierten Connexins. Im allgemeinen zeigte die heterologe Kopplung verglichen mit der homologen Kopplung einen geringeren Transfer des Calceins (Abb. 14, 15).

Auch die Jeg3- α hCG/Cx43-Transfektanten zeigten eine schwache aber signifikante Kopplung mit den bEnd3-Zellen (Klon #2: 23,8%, Vektorkontrolle: 13%; n=4; nicht gezeigt).

Dagegen konnte keine heterologe Kopplung zwischen bEnd3-Zellen und Jeg3-Tet/Cx26-Transfektanten nachgewiesen werden (Abb. 15B). Beide analysierten Cx26-Klone #5 und #9 zeigten auch nach Induktion mit Dox keine Erhöhung der Kopplung. Die Kopplungsraten beider Klone lagen etwa auf der Höhe der Vektorkontrollen (Klon #5 + Dox: 13,8%, Klon #9 + Dox: 17,2%, Vektorkontrolle + Dox: 17%; n=4).

Zur näheren Klärung der Frage nach der Rolle der heterologen Kommunikationsmöglichkeit für die Invasionseigenschaften der Jeg3-Zellen werden zur Zeit *in vitro*-Invasionsassays mit bEnd3-Endothelzellen in Kokultur mit Jeg3-Cx-Transfektanten durchgeführt. Diese Versuche werden von einer Medizin-Doktorandin bearbeitet, die im Rahmen dieses Projektes eine Doktorarbeit anfertigt.

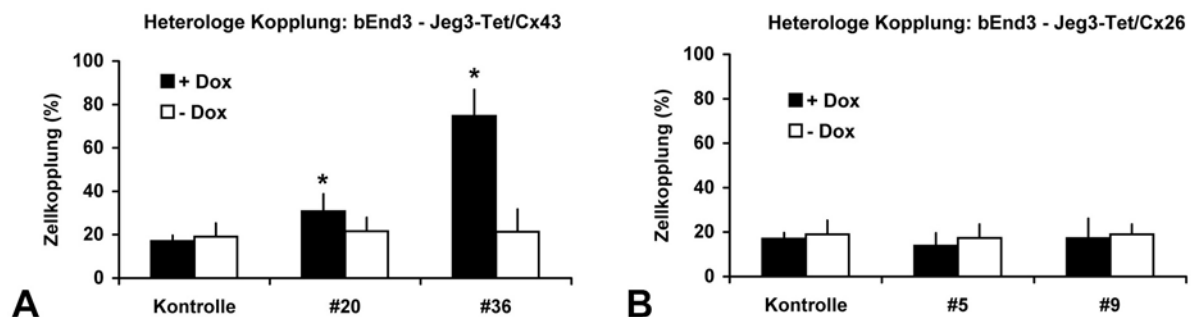


Abb. 15: Quantifizierung der heterologen Kopplung zwischen bEnd3-Zellen und Jeg3-Tet-Transfektanten mittels FACS-Analyse vor und nach 48 h Dox-Induktion. Heterologe Kopplung zwischen bEnd3-Zellen und Tet/Cx43- (A) sowie Tet/Cx26-Transfektanten (B) im Vergleich zur Vektorkontrolle (= Kontrolle). Die Stärke der Zellkopplung ist in % angegeben. Nur die Cx43-Transfektanten konnten mit bEnd3-Zellen heterolog koppeln (A), während die Cx26-Transfektanten keine Kopplung mit bEnd3-Zellen zeigten (B). Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=4). * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Dox-behandelten (+ Dox) und unbehandelten Zellklonen (- Dox) und zwischen Dox-behandelten Klonen und Vektorkontroll-Zellen.

4.3 Untersuchung der Zellphysiologie der Jeg3-Cx-Transfektanten

4.3.1 Analyse der Zellproliferation *in vitro*

Um den Einfluß der exogenen Cx-Expression auf das Zellwachstum der Jeg3-Zellen zu untersuchen, wurde das Proliferationsverhalten der Jeg3-Cx-Transfektanten zunächst *in vitro* analysiert.

Für diese Versuche wurde eine identische Anzahl an Zellen ausplattiert und der Proliferationsverlauf von jeweils drei Parallelproben pro Versuchsansatz über einen Zeitraum von 7-11 Tagen ermittelt. Neben den Cx43-, Cx40-, Cx26- und trCx43-Transfektanten wurde auch die Proliferation der Vektorkontroll-Zellen ermittelt.

Jeg3-Cx43-Transfektanten

In Abbildung 16A ist das Proliferationsverhalten von zwei Jeg3-Tet/Cx43-Transfektanten mit und ohne Gabe von Dox dargestellt. Es zeigte sich, daß die induzierten Cx43-Klone ein reduziertes Wachstum im Vergleich zu den uninduzierten Klonen aufwiesen. Das Wachstum der Dox-induzierten Transfektante #36 war am Tag 10 der Kultivierung signifikant um 50% gegenüber dem uninduzierten Zustand reduziert (Abb. 16H). Außerdem war eine Proliferationsreduktion im Klon #20 im Mittel um das 1,45fache (Tag 11) und im Klon #48 (nicht dargestellt) um das 1,4fache (Tag 10) gegenüber den uninduzierten Zellen zu erkennen. Auffällig waren Unterschiede im Zeitverlauf der Proliferation bei den einzelnen Klonen. Während der Klon #36 schon am Tag 5 eine starke Reduktion der Proliferation aufwies, zeigte Klon #20 erst nach einer Woche eine Abnahme des Zellwachstums (Abb. 16A). Ebenso konnte eine signifikante Reduktion der induzierten Klone #20 und #36 im Zellwachstum am Tag 10 (Tag 11: Klon #20) gegenüber den Vektorkontroll-Zellen beobachtet werden (Abb. 16B, H). Klon #36 wies im Durchschnitt eine 2,7fache und Klon #20 eine 1,4fache Reduktion der Proliferation im Vergleich zu den Vektorkontroll-Zellen auf. Eine Wirkung des Antibiotikums Doxzyklin auf das Proliferationsverhalten der Cx43-Transfektanten konnte anhand der Vektorkontrolle ausgeschlossen werden. Hier konnte keine Veränderung des Proliferationsverhaltens unter Dox-Behandlung beobachtet werden (Abb. 16H).

Es konnte keine eindeutige individuelle Korrelation zwischen dem Proliferationsverhalten der Cx43-Klone, der Stärke der Connexin-Expression und der Höhe des Kopplungsvermögens beobachtet werden (vgl. Abb. 7, 9 und 14).

In der Abbildung 16C ist der Proliferationsverlauf der Jeg3- α hCG/Cx43-Transfektanten, jeweils mit und ohne cAMP-Behandlung der Zellen, gezeigt. Wie schon dargestellt, kann die Cx43-Expression über die Gabe von cAMP bei den α hCG/Cx43-Transfektanten gesteigert werden (siehe Abb. 10). Die zwei analysierten Klone #2 und #22 wiesen nach cAMP-Gabe eine starke Reduktion des Zellwachstums gegenüber den unbehandelten Zellen auf (Abb. 16C). Während Klon #2 am Tag 7 der Kultivierung im Durchschnitt eine signifikante 12fache Reduktion der Proliferation gegenüber den ohne cAMP kultivierten Zellen zeigte, konnte beim Klon #22 eine 3fache Reduktion detektiert werden (Abb. 16I). Die starke Proliferationsreduktion des Klon #2 korrelierte mit der drastischen Erhöhung der Cx43-Expression nach Gabe von cAMP (siehe Abb. 10). Zum Vergleich wurde auch die Proliferation der Vektorkontroll-Zellen mit und ohne cAMP-Behandlung bestimmt (Abb. 16C, I). Auch in der Vektorkontrolle konnte eine signifikante Reduktion der Zellproliferation nach cAMP-Gabe beobachtet werden. Jedoch zeigte sich, daß das Wachstum der beiden cAMP-behandelten Cx43-Klone am Tag 7 gegenüber der mit cAMP-behandelten Vektorkontrolle signifikant reduziert war (Klon #2: 5,6fach und #22: 1,9fach).

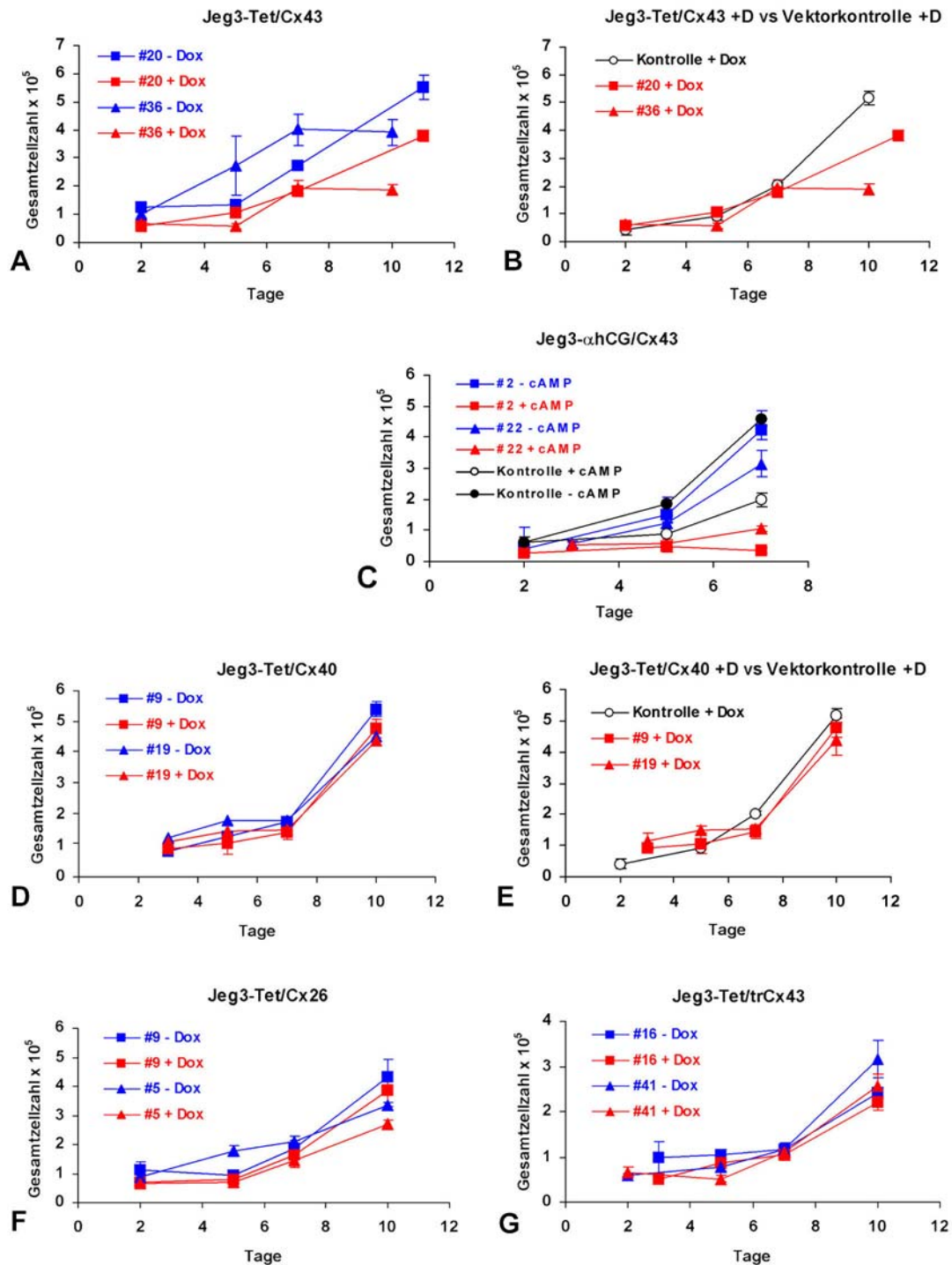


Abb. 16: (A-G) Proliferationsverhalten der Jeg3-Cx-Transfektanten *in vitro*. (A, D, F, G) Proliferationsverlauf von je zwei Tet/Cx43- (A), Tet/Cx40- (D), Tet/Cx26- (F) und Tet/trCx43- Transfektanten (G) mit und ohne Dox-Kultivierung. (B, E) Vergleichende Proliferationskurven der zwei induzierten Tet/Cx43-Transfektanten (B) sowie der induzierten Tet/Cx40-Transfektanten (E) gegenüber der induzierten Vektorkontrolle (= Kontrolle). vs: versus; +D: + Dox. (C) Proliferationsverlauf der α hCG/Cx43-Transfektanten gegenüber der Vektorkontrolle mit und ohne cAMP-Behandlung. Aufgetragen ist die Gesamtzellzahl $\times 10^5$ gegen die Zeit der Kultivierung in Tagen. Während die Cx40-, Cx26- und trCx43-Transfektanten keinen Unterschied in ihrem Proliferationsverhalten nach Dox-Induktion aufwiesen, zeigten die Tet/Cx43-Transfektanten nach Dox-Induktion und die α hCG/Cx43-Transfektanten nach cAMP-Gabe eine Reduktion der Zellproliferation. Abb. 16H und I siehe nächste Seite.

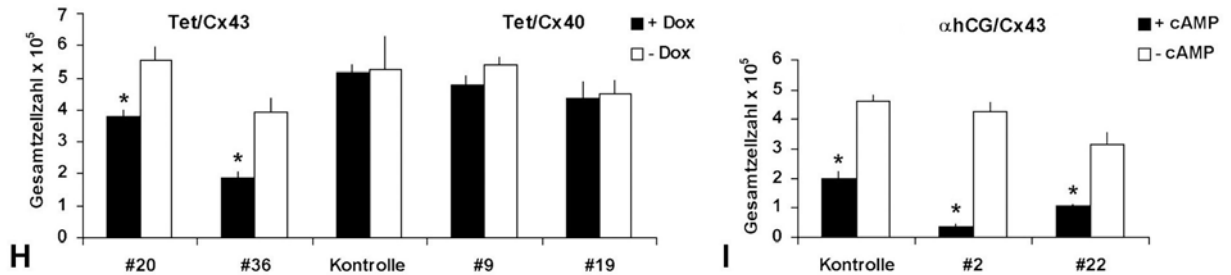


Abb. 16: (H, I) Proliferationsverhalten der Jeg3-Cx-Transfektanten *in vitro*. (H) Quantitative Auswertung der Gesamtzellzahl der zwei Tet/Cx43- und Tet/Cx40-Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle (= Kontrolle) mit und ohne Dox-Behandlung am Tag 10 bzw. 11 nach dem Ausplattieren. Tet/Cx43/#20: Tag 11. (I) Quantitative Auswertung der Gesamtzellzahl der zwei αhCG/Cx43-Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle mit und ohne cAMP-Behandlung am Tag 7 nach dem Ausplattieren. * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen behandelten (+ Dox bzw. + cAMP) und unbehandelten Zellklonen und zwischen behandelten Klonen und Vektorkontroll-Zellen. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$).

Jeg3-Tet/Cx40-Transfektanten

Abbildung 16D zeigt den Proliferationsverlauf der induzierten versus uninduzierten Cx40-Transfektanten. Die beiden dargestellten Klone #9 und #19 zeigten keinen Unterschied in der Proliferation über die Kultivierung von 10 Tagen. Auch der Klon #13 wies keine Veränderung des Wachstums im Cx40-induzierten gegenüber dem uninduzierten Zustand auf (nicht dargestellt). Die Proliferation der beiden induzierten Klone #9 und #19 verlief ähnlich wie die der Vektorkontrolle (Abb. 16E, H).

Jeg3-Tet/Cx26-Transfektanten

Auch zwischen Dox-induzierten und uninduzierten mit Cx26-transfizierten Jeg3-Zellen konnte kein deutlicher Unterschied im Proliferationsverhalten beobachtet werden (Abb. 16F). Der Klon #5 wies zwar eine schwache Wachstumsminderung unter Dox-Gabe auf, die aber wie beim Klon #9 nicht signifikant war.

Jeg3-Tet/trCx43-Transfektanten

Das Zellwachstum der trCx43-Transfektanten wies wie das der Cx40-Zellklone keine signifikante Reduktion nach Gabe von Dox auf (Abb. 16G). Nach der Induktion der Cx-Expression mit Dox zeigten die beiden Klone #16 und #41 keine Veränderung des Wachstumsverhaltens im Vergleich zu uninduzierten Zellen.

4.3.2 Bestimmung der Expression und Sekretion von βhCG

Das spezifische Plazenta-Hormon βhCG wird von Chorionkarzinomen sowie von der Jeg3-Zelllinie produziert und ist ein Markergen für die Trophoblast-Differenzierung (Kohler et al., 1971; Kliman et al., 1986). Daher sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede in der βhCG- Hormonproduktion und somit in der Differenzierung zwischen den mit verschiedenen Connexinen transfizierten Jeg3-Zellen ergeben. Da Cx40 in der frühen Plazenta in den

relativ undifferenzierten proliferierenden Trophoblastzellen des extravillösen Trophoblasten und Cx43 in den terminal differenzierten Zellen des Trophoblasten exprimiert ist (vgl. 1.3; Winterhager et al., 1999; Cronier et al., 1997, 2002), wurden die Versuche auf die Analyse der β hCG-Sekretion in den Tet/Cx43- und Tet/Cx40-Transfektanten fokussiert. Dazu wurde das Medium der uninduzierten und mit Dox-induzierten Zellen am 10. Tag der Proliferation entnommen und auf die Menge an β hCG untersucht.

Es konnten keine deutlichen Unterschiede in der Hormonsekretion zwischen induzierten und uninduzierten Transfektanten beobachtet werden (nicht dargestellt). Dagegen zeigten sich zwischen den induzierten Cx43- und Cx40-Zellklonen Unterschiede. In der Abbildung 17A ist die β hCG-Sekretion der induzierten Cx43-Transfektanten (#20, #36, #48) im Vergleich zu den induzierten Cx40-Zellklonen (#9, #13, #19) über einen Zeitraum von 24 h nach 10 Tagen Kultivierung gezeigt. Die parentalen Jeg3-Zellen wiesen die stärkste β hCG-Hormonproduktion auf. Es konnte eine signifikante Reduktion der β hCG-Produktion der drei Cx40-Transfektanten gegenüber den parentalen Jeg3-Zellen nachgewiesen werden. Die Cx43-Transfektanten zeigten eine stärkere β hCG-Sekretion gegenüber den Cx40-Transfektanten, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Die Analyse der Expression der β hCG-mRNA mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR bestätigte die Ergebnisse der β hCG-Sekretion (Abb. 17B). Auch die Expression der β hCG-mRNA war hier in den induzierten Cx43-Transfektanten nach Dox-Induktion gegenüber den induzierten Cx40-Klonen im Mittel 2,5fach signifikant erhöht. Keine signifikante Regulation zeigte sich jedoch im Vergleich zwischen induzierten und uninduzierten Transfektanten (nicht dargestellt). Die mit Cx43 transfizierten Jeg3-Zellen zeigten damit neben einer reduzierten Proliferation auch eine verstärkte β hCG-Sekretion und -Expression im Vergleich zu den Cx40-Transfektanten.

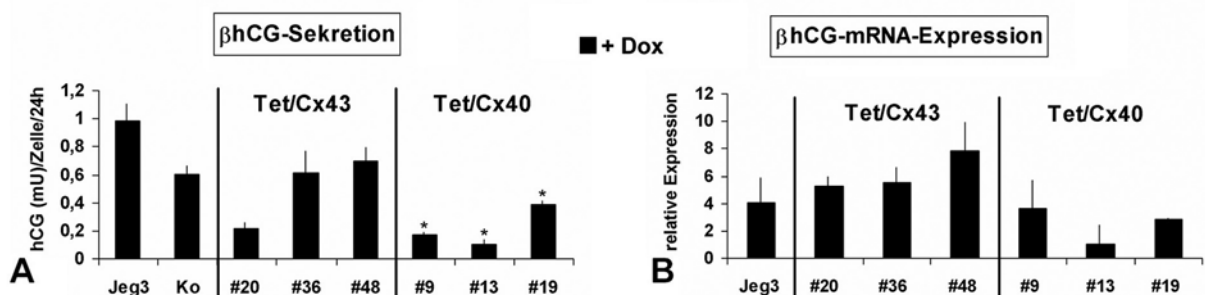


Abb. 17: β hCG-Sekretion und β hCG-mRNA-Expression in Dox-induzierten Tet/Cx43- und Tet/Cx40-Transfektanten. (A) β hCG-Sekretion über einen Zeitraum von 24 h nach 10 Tagen Kultivierung von je drei Dox-induzierten Tet/Cx43- und Tet/Cx40-Transfektanten. Als Vergleich sind die parentalen Jeg3-Zellen und die Vektorkontroll-Zellen (= Ko) dargestellt. * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen induzierten Tet/Cx40-Zellklonen und parentalen Jeg3-Zellen. (B) Semiquantitative RT-PCR-Analyse der β hCG-Expression in den drei Dox-induzierten Tet/Cx43- und Tet/Cx40-Transfektanten. Dargestellt ist die relative β hCG-Expression nach dem Abgleich gegen β -Aktin. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (A: $n=3$, B: $n=2$).

4.4 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Jeg3-Cx-Transfektanten in Nacktmäusen

Das Wachstumsverhalten der Jeg3-Cx-Transfektanten wurde *in vivo* im Nacktmausmodell untersucht. Experimente mit parentalen Jeg3-Zellen haben gezeigt, daß diese nach subkutaner Injektion in die Nacktmaus sehr rasch wachsende Tumore bilden (Grümmer et al., 1999). Dabei war die Tumorbildung der Jeg3-Zellen durch eine Arrosion der Wirtsgefäße und eine Bildung von blutgefüllten Lakunen gekennzeichnet (Abb. 18B). Der maligne Trophoblast wies dabei ein ähnliches Invasionsverhalten wie der normale Trophoblast in das endometriale Gewebe und in die maternalen Blutgefäße auf. Daher eignete sich dieses Modell besonders, um die Rolle verschiedener Connexine für die Trophoblast-Proliferation und -Invasion zu untersuchen.

Für die Analyse des Wachstums- und Invasionsverhaltens der Jeg3-Cx-Transfektanten wurden $2,5 \times 10^6$ -Zellen subkutan in die Flanke von männlichen Nacktmäusen injiziert. Jedem Versuchstier wurde zum direkten Vergleich die Vektorkontrolle in die linke und die Connexin-Transfektante in die rechte Flanke inokuliert (Abb. 18A). Dabei erfolgte die Fokussierung auf die Analyse der Cx43-, Cx40- und trCx43-Transfektanten. Es wurden je 3 Klone der Tet/Cx43- und Tet/Cx40-, 2 Klone der Tet/trCx43- und 1 Klon der α hCG/Cx43-Transfektanten im Nacktmausmodell untersucht (siehe Tab. 7, Anhang 8.2). Dabei wurden 6 bis 14 Tiere pro Versuchsansatz eingesetzt. In den Tieren, die mit den Dox-induzierten Tet-Transfektanten injiziert wurden, wurde die Dox-Induktion zum einen durch die Gabe von Dox im Trinkwasser und zum anderen durch subkutane Applikation von Dox alle drei Tage beibehalten. Bei der Untersuchung der Tet-Transfektanten diente zum einen die Vektorkontrolle in derselben Maus als direkte Kontrolle und zum anderen sollten jeweils die uninduzierten Klone in weiteren Mäusen getestet werden. Das Tumorstadium wurde über einen Zeitraum von ca. 3 Wochen (17-23 Tage) je nach Tumorentwicklung beobachtet und die Tumorstadien jeden 2./3. Tag ermittelt. Auffällig war ein stark heterogenes Tumorstadium zwischen den Nacktmäusen (siehe Tab. 7, Anhang 8.2).

Die Tumore wurden herauspräpariert, auf ihre Connexin-Expression mittels Northern-Blot-Analyse sowie Immunhistochemie analysiert und das Invasionsverhalten sowohl morphologisch als auch immunhistochemisch untersucht. Anhand der berechneten Tumorstadien wurden Wachstumskurven erstellt.

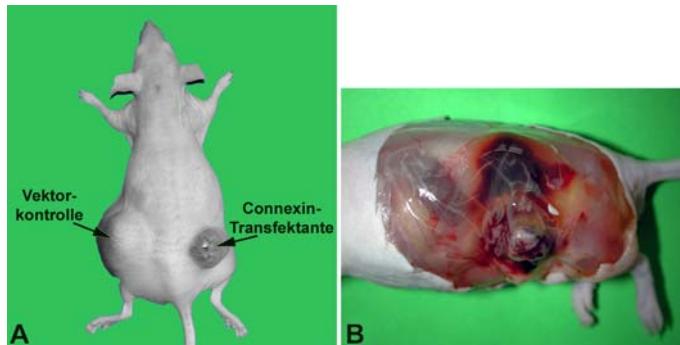


Abb. 18: Wachstumsverhalten der Jeg3-Cx-Transfektanten in der Nacktmaus. (A) Exemplarisches Bild einer Nacktmaus am Versuchsende. Zum direkten Vergleich wurde in die rechte Flanke die Connexin-Transfektante (hier Jeg3-Tet/Cx43/#36 + Dox) und in die linke Flanke die Vektorkontroll-Zellen subkutan injiziert. Der Cx43-Tumor ist im Vergleich zum Vektorkontroll-Tumor deutlich reduziert. (B) Nacktmaus mit Tumor (*in situ*-Ansicht). Die Haut wurde entfernt. Der Tumor ist durch eine rote Färbung durch blutgefüllte Lakunen charakterisiert.

4.4.1 Nachweis der Connexin-Expression im Tumorgewebe

In Abbildung 19A-D sind die Northern-Blot-Analysen der Cx43-, Cx40- und trCx43-Tumore exemplarisch anhand einzelner Zellklone dargestellt. Für diese mRNA-Expressionsanalyse wurde nach Möglichkeit nur Tumorgewebe ohne umliegendes Mausegewebe eingesetzt. Es konnte in allen Dox-induzierten Tumoren eine Expression des exogenen Connexins im Vergleich zur Vektorkontrolle und den uninduzierten Tumoren gezeigt werden (19A-C). Ebenso konnte eine exogene Cx43-Expression in den α hCG/Cx43-Tumoren gegenüber der Vektorkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 19D). Die Cx-Expressionsstärke war nahezu identisch im Vergleich zur Expression der jeweiligen Zelltransfektante *in vitro*. Jedoch gab es z.T. leichte Unterschiede in der Expressionsstärke bei den einzelnen Tumoren aller Cx-Transfektanten. Besonders auffällig waren Schwankungen in der Cx43-Expression in den α hCG/Cx43-Tumoren. Einzelne Tumore zeigten eine sehr starke Expression des Cx43-Transkriptes (siehe Abb. 19D, tu64/1r). Die Überprüfung der Cx-Protein-Expression mittels Immunhistochemie bestätigte die Ergebnisse der Expression auf der RNA-Ebene (Abb. 20). In allen induzierten Tumoren und α hCG/Cx43-Tumoren konnte eine Expression des jeweiligen Cx-Proteins in den Tumorzellen entlang der Zellmembran und auch intrazellulär nachgewiesen werden. Diese korrelierte mit der Expression auf der RNA-Ebene (Abb. 19). Keine oder eine schwache Cx-Protein-Expression zeigten die Vektorkontroll-Tumore sowie die uninduzierten Tumore (Abb. 20C, D). Auffällig war, daß in den Cx43-Tumoren, sowohl in den Tet/Cx43- als auch in den α hCG/Cx43-Tumoren, viele Riesenzellen (*giant cells*) eine starke Cx43-Expression aufwiesen (Abb. 20A Ausschnitt, Pfeil in Abb. 20E).

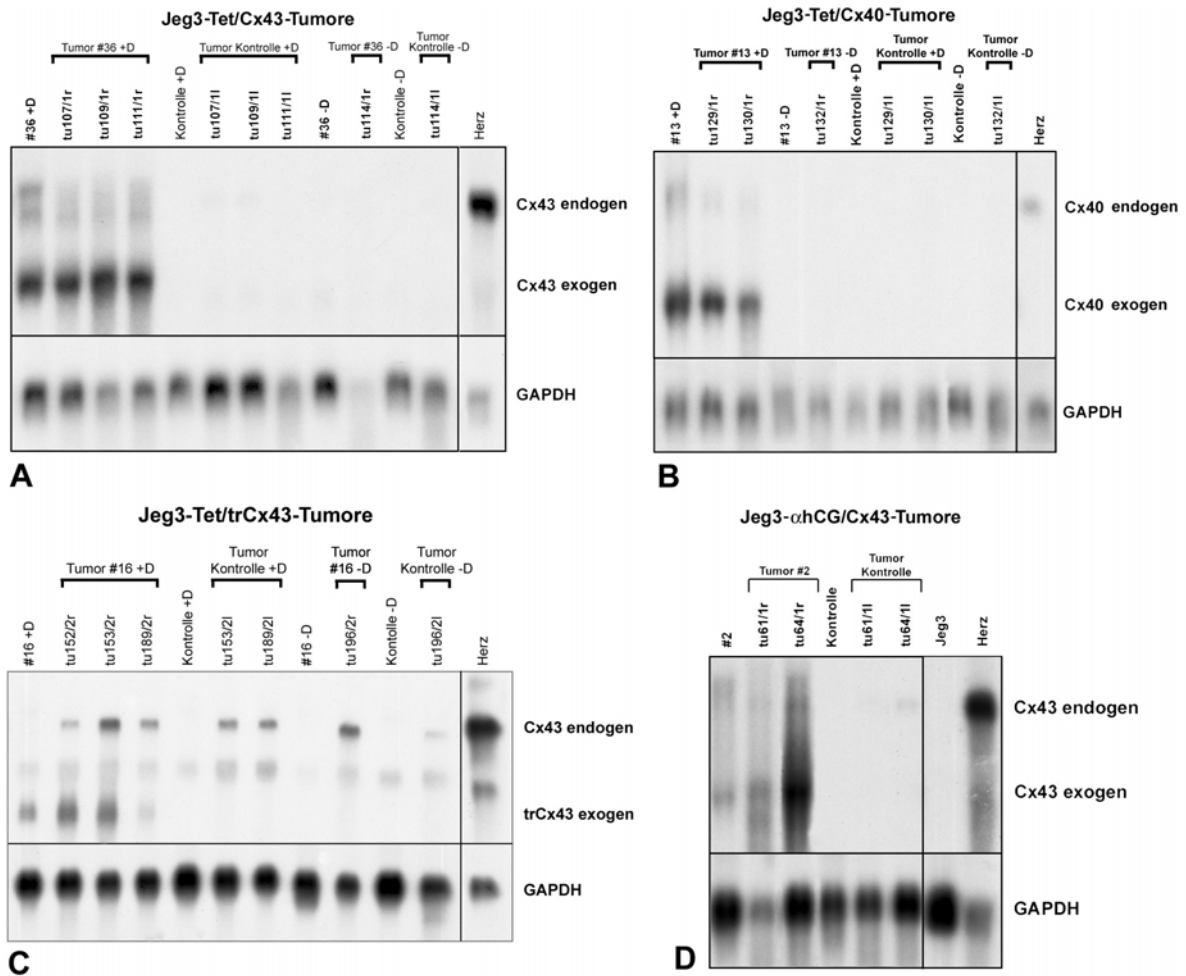


Abb. 19: Northern-Blot-Analyse der Cx-Expression in Cx43-, Cx40- und trCx43-Jeg3-Tumoren. (A) Tet/Cx43/#36-, (B) Tet/Cx40/#13-, (C) Tet/trCx43/#16- und (D) α hCG/Cx43/#2-Tumore. Aufgetragen wurden je 5 μ g Gesamt-RNA. Als Kontrollen dienten: jeweilige Zellklone *in vitro*, Kontrolle = Vektorkontrolle, parentale Jeg3-Zellen und Herzgewebe. Jede Autoradiographie zeigt jeweils die Cx-Expression des Zellklons *in vitro* und der Tumore im Vergleich zur Expression der Vektorkontrolle *in vitro* und der Vektorkontroll-Tumore. Zum Vergleich ist die GAPDH-Expression dargestellt. Es konnte die Expression der jeweiligen transfizierten Connexine auch in den Tumoren bestätigt werden. (C) Die endogenen Cx43-Signale in den Tet/trCx43/#16- und Vektorkontroll-Tumoren sind auf das restliche Mausgewebe am Tumor bei der Präparation zurückzuführen. +D: + Dox, -D: - Dox, tu: Tumor, l: linke Flanke, r: rechte Flanke.

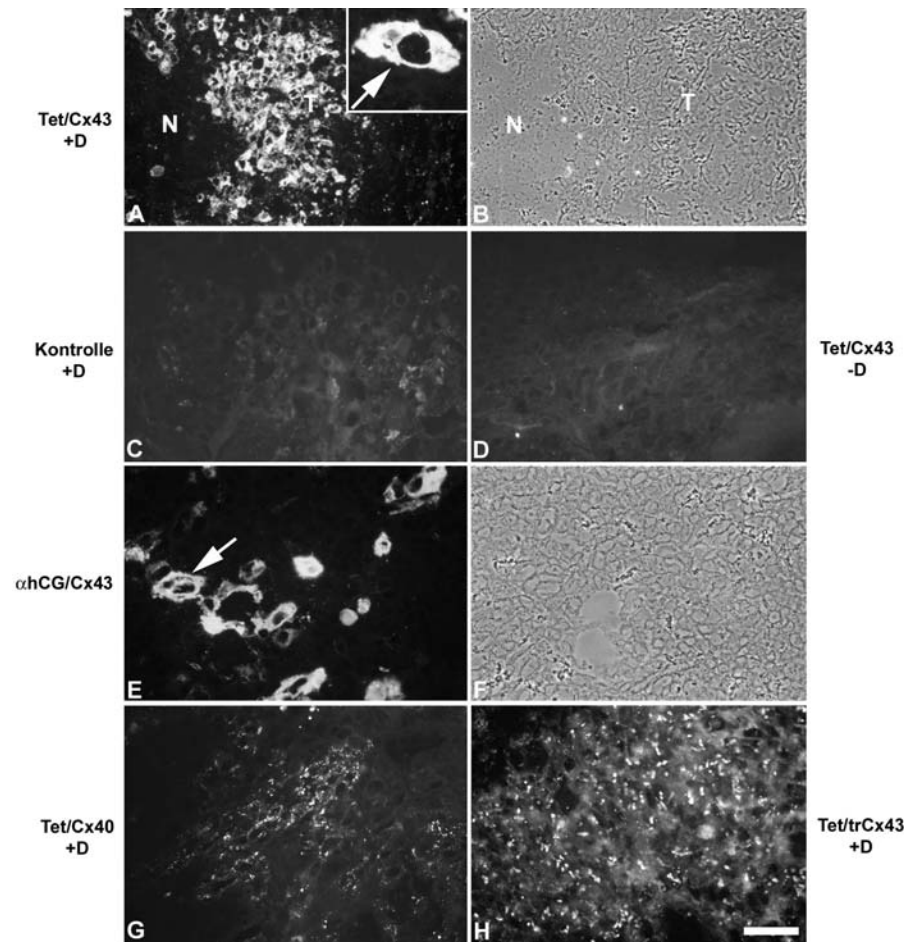


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis von Cx43, Cx40 und trCx43 in Jeg3-Tumoren. (A, C, D, E, G, H) Fluoreszenzaufnahmen; (B, F) Phasenkontrastaufnahmen. (A, B) Tet/Cx43/#36-Tumor +D, (C) entsprechender Vektorkontroll-Tumor (Kontrolle +D) zu (A, B), (D) Tet/Cx43/#36-Tumor -D, (E, F) α hCG/Cx43/#2-Tumor, (G) Tet/Cx40/#13-Tumor +D und (H) Tet/trCx43/#16-Tumor +D. Nachweis von Cx43 (A, C, D, E, H) und Cx40 (G). Dargestellt ist eine starke Cx43-Expression in Tumorzellen des induzierten Tet/Cx43/#36- (A) und des α hCG/Cx43/#2-Tumors (E) gegenüber keiner Expression in der induzierten Vektorkontrolle (C) und dem uninduzierten Tet/Cx43/#36-Tumor (D). Ausschnitt in (A) zeigt eine Cx43-positive Trophoblast-Riesenzelle. Pfeil in (E) weist ebenfalls auf Cx43-markierte Riesenzellen hin. Ebenso konnte eine Cx40-Expression im induzierten Tet/Cx40/#13-Tumor (G) und eine trCx43-Expression im induzierten Tet/trCx43/#16-Tumor nachgewiesen werden. +D: + Dox, -D: - Dox. T: Tumor, N: Nekrose. Balken: 40 μ m, Ausschnitt in (A) 10 μ m.

4.4.2 Charakterisierung des Invasionsverhaltens *in vivo*

Durch die Transfektion verschiedener Cx-Gene in die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 sollte untersucht werden, ob es zu einem unterschiedlichen Invasionsverhalten der Transfektanten *in vivo* im Nacktmausmodell kommt. Humane Chorionkarzinomzelllinien werden auch als *in vitro*- und *in vivo*-Modell für die Invasion des frühen Trophoblasten verwendet (Grümmer, 1991).

Die analysierten Jeg3-Tumore der Transfektanten und der parentalen Zellen waren durch eine schwammige Konsistenz in der Struktur und durch eine rote Färbung charakterisiert (Abb. 18B; Grümmer et al., 1999). Dies resultierte aus der massiven Ansammlung von Blutlakunen im Tumor durch Arrosion der Wirtsgefäße.

Die Morphologie der Jeg3-Tumore der Connexin-Transfektanten wurde anhand von HE-gefärbten Paraffin- und Technovitschnitten untersucht. In Abbildung 21 sind jeweils Übersichts- und Ausschnittsvergrößerungen von Cx43-, Cx40- und trCx43-Tumoren dargestellt.

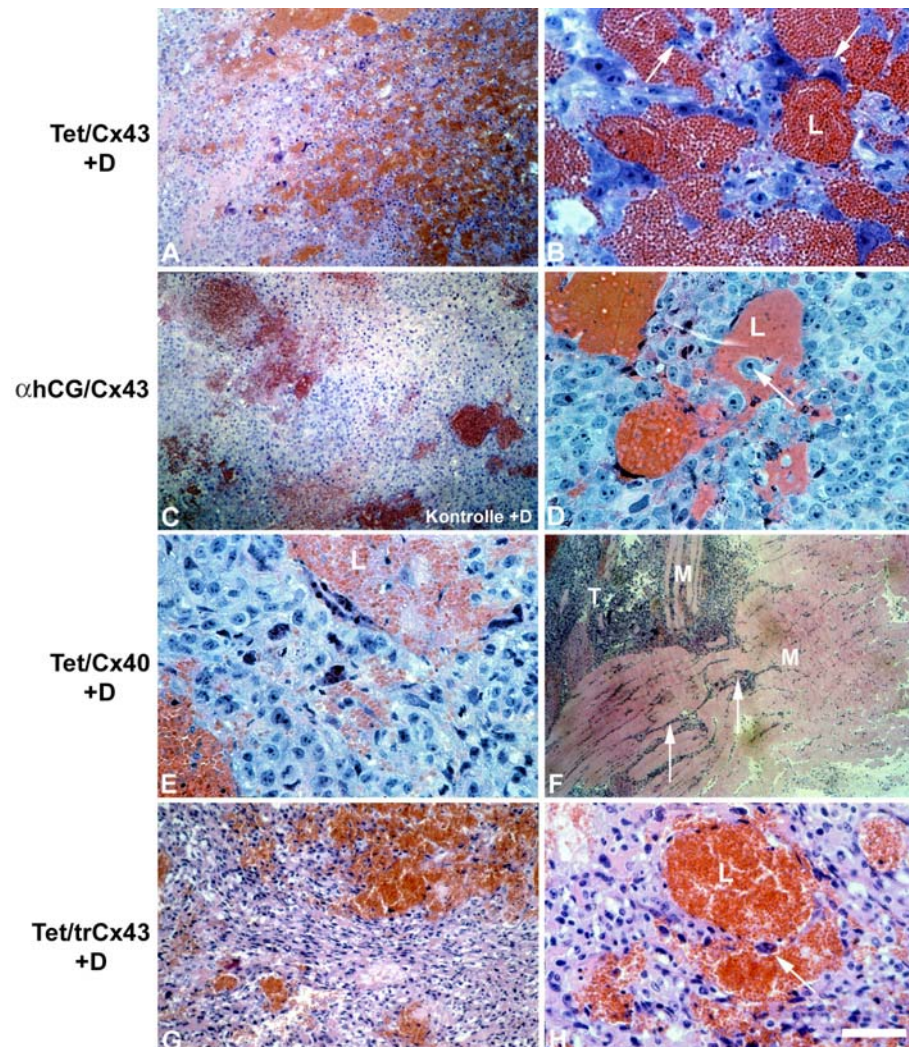


Abb. 21: Morphologie der Jeg3-Cx-Tumore nach subkutanem Wachstum in der Nacktmaus. (A, C, F, G) Übersicht, (B, D, E, H) Ausschnittsvergrößerung. HE-Färbung. (A, B) Tet/Cx43/#36-Tumor +D, (C) Vektorkontrolle (= Kontrolle) +D, (D) α hCG/Cx43/#2-Tumor, (E, F) Tet/Cx40/#13-Tumor +D und (G, H) Tet/trCx43/#16-Tumor +D. Auffällig war die Ansammlung von blutgefüllten Lakunen in allen Tumoren und die Anwesenheit von Trophoblast-Riesenzellen am Rand der Lakunen und in den Lakunen (Pfeile in B, D, H). In (F) ist die Invasion der Cx40/#13-Tumorzellen in das Muskelgewebe der Maus dargestellt (siehe Pfeile). +D: + Dox, T: Tumor, L: Lakunen, M: Muskelgewebe. Balken: (B, D, E, H) 100 μ m, (G) 200 μ m, (A, C, F) 250 μ m.

In allen analysierten Tumoren konnten z.T. große blutgefüllte Lakunen detektiert werden, in denen häufig Trophoblast-Riesenzellen zu finden waren (Pfeile in Abb. 21B, D, H). Die Lakunen entstehen in allen Cx-Tumoren wie auch in den Vektorkontroll-Tumoren durch Invasion der Trophoblastzellen in die Blutgefäße und durch Ersetzen der Endothelzellen. Eine Bewertung und Zuordnung der verschiedenen Cx-Transfektanten zu einem

charakteristischen Invasionsmuster war wegen der hohen Varianz des Wachstumsverhaltens der Tumore zwischen den Tieren sehr schwierig. Individuelle Eigenschaften der einzelnen Zellklone traten dabei in den Hintergrund. Ferner waren die Tumore, besonders die großen Tumore, teilweise stark nekrotisch. Die Untersuchungen ergaben, daß der Aufbau der Cx43-Tumore, sowohl der Tet/Cx43- als auch der α hCG/Cx43-Tumore, in der Übersicht geordneter erschien und viele Trophoblast-Riesenzellen vorhanden waren (Abb. 21A, B, D). Die Cx40-Tumore wiesen eher eine invasivere Struktur auf und waren aus kleineren Zellen aufgebaut (Abb. 21E, F). In Abbildung 21F ist eine Invasion der Cx40-transfizierten Trophoblastzellen in das Muskelgewebe der Maus dargestellt (siehe Pfeile). Die trCx43-Tumore waren ebenfalls wie die Cx43-Tumore durch eine geordnete Struktur gekennzeichnet und wiesen fischzugähnliche kleine Zellen auf (Abb. 21G, H). Solche Strukturen waren in den Vektorkontroll-Tumoren nicht zu erkennen (Abb. 21C).

Weiterhin wurde die Gefäßdichte der Tumore mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises mit einem endothelzellspezifischen Antikörper PAN (PAN = panendothelialer Antikörper) analysiert. Jedoch zeigten sich nach den ersten mikroskopischen Begutachtungen keine auffälligen Unterschiede in der Anzahl an Gefäßen in den untersuchten Cx43-, Cx40- und trCx43-Tumoren und zugehörigen Vektorkontroll-Tumoren. Daher erfolgte auch keine quantitative Auswertung der Gefäßdichte. Als Beispiel sind in der Abbildung 22 Schnitte von Cx43- und Cx40-Tumoren dargestellt, die jeweils mit dem endothelzellspezifischen Antikörper PAN und einem Cytokeratin-Antikörper (Trophoblastzell-Marker; Anfärbung der Intermediärfilamente der Epithelzellen) immunhistochemisch markiert wurden.

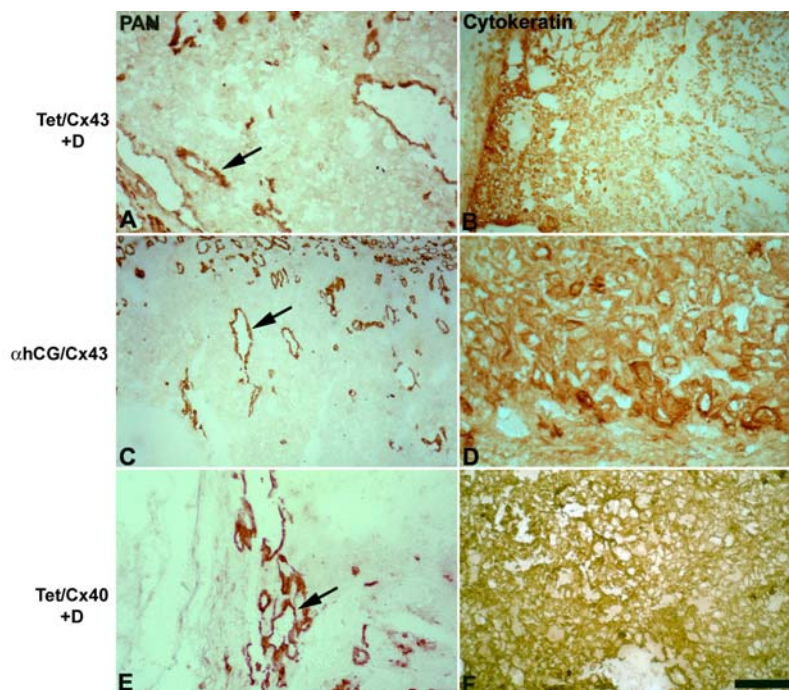


Abb. 22: Immunhistochemische Markierung der Endothelzellen (PAN-Antikörper) und der Trophoblastzellen (Cytokeratin-Antikörper) in Cx43- und Cx40-Tumoren. (A, C, E) PAN-Markierung (Marker für Gefäße), (B, D, F) Cytokeratin-Markierung (Trophoblastzell-Marker). (A, B) Tet/Cx43/#36-Tumor +D, (C, D) α hCG/Cx43/#2-Tumor, (E, F) Tet/Cx40/#13-Tumor +D. Es war kein Unterschied in der Dichte der Gefäße bei den unterschiedlichen Jeg3-Cx-Tumoren zu erkennen (A, C, E; Pfeile zeigen die Anfärbung der Gefäße). +D: + Dox. Balken: (D) 100 µm, (A, E, F) 150 µm, (B, C) 200 µm.

In weiteren Versuchen wurden Markermoleküle für die Invasion wie die Integrine β_4 und α_6 und der EGF-Rezeptor (EGF-R) analysiert, die bei der Invasion des benignen Trophoblasten eine Rolle spielen (Damsky et al., 1992, 1994; Fisher and Damsky, 1993; Jokhi et al., 1994). In parental Jeg3-Tumoren konnte eine starke Expression von Integrin β_4 und α_6 nachgewiesen werden (Fimpeler et al., 2001). Die Untersuchung der beiden Integrine β_4 und α_6 mittels Immunhistochemie zeigte eine deutliche Expression beider Integrine in Cx43- und Cx40-Tumoren und den entsprechenden Vektorkontrollen, jedoch kein Unterschied im Expressionsmuster (Abb. 23). Desweiteren konnte die Expression von Integrin α_1 in den Tumoren nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Auch hier war kein Unterschied zwischen den Tumoren der verschiedenen Cx-Transfektanten und den Kontrollen zu detektieren. D.h. alle Jeg3-Tumore wiesen eine homogene Expression der Integrine β_4 , α_1 und α_6 unabhängig vom transfizierten Connexin auf.

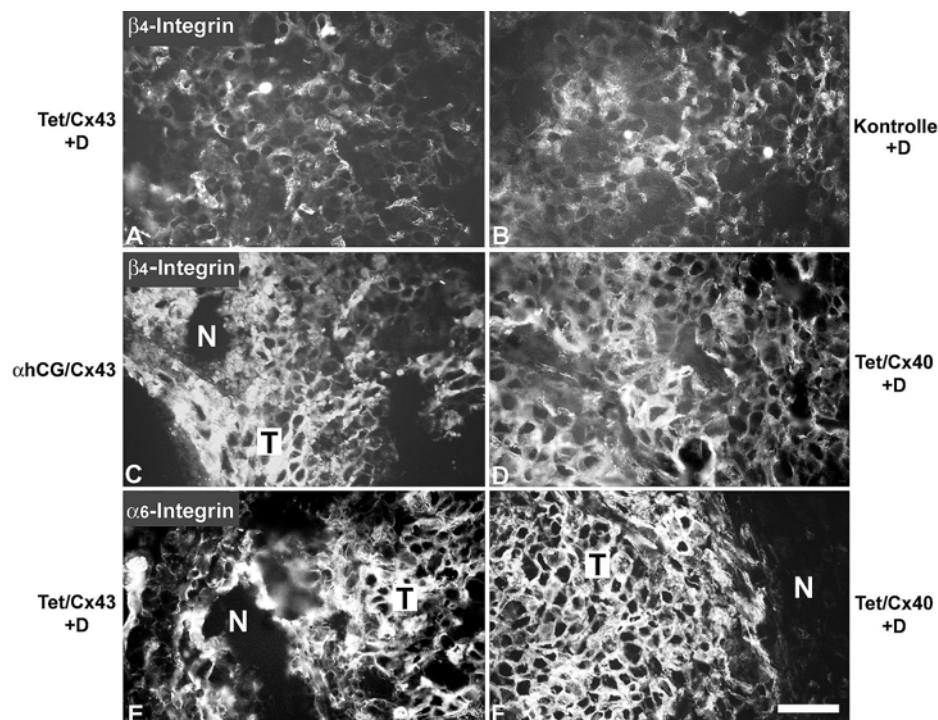


Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis der Integrine β_4 und α_6 in Cx43- und Cx40-Tumoren. Fluoreszenzaufnahmen. (A-D) β_4 -Integrin, (E, F) α_6 -Integrin. (A) Tet/Cx43/#36-Tumor +D mit entsprechendem Vektorkontroll-Tumor (= Kontrolle) +D (B), (C) α hCG/Cx43/#2-Tumor, (D) Tet/Cx40/#13-Tumor +D, (E) Tet/Cx43/#36-Tumor +D, (F) Tet/Cx40/#13-Tumor +D. Alle Tumore zeigten eine starke Expression sowohl von β_4 - als auch von α_6 -Integrin. +D: + Dox, T: Tumor, N: Nekrose. Balken: 40 μ m.

Die Analyse der EGF-R-Expression mit Hilfe der Immunhistochemie ergab Unterschiede zwischen den Cx43-Tumoren und den entsprechenden Vektorkontroll-Tumoren (Abb. 24). Die Cx43-Tumore zeigten eine stärkere Expression von EGF-R als die Vektorkontroll-Tumore. Zudem konnte auch eine stärkere Expression der Cx43-Tumore gegenüber den Cx40-Tumoren nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Dagegen war kein Unterschied in

der Expression in den Cx40-Tumoren im Vergleich zu den entsprechenden Vektorkontrollen zu erkennen (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse konnten auch in semiquantitativen RT-PCR-Analysen der EGF-R-Expression in den Tumoren bestätigt werden (Abb. 24E). In den analysierten Cx43-Tumoren (n=3) konnte im Durchschnitt eine 1,6 bis 2,2fache Erhöhung der Expression des EGF-Rezeptors gegenüber der entsprechenden Vektorkontrolle nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die untersuchten induzierten Cx40-Tumore (n=2) keinen deutlichen Unterschied in der Expression des EGF-Rezeptors im Vergleich zur Vektorkontrolle.

Die morphologischen Untersuchungen zum Invasionsverhalten der verschiedenen Cx-Transfektanten *in vivo* anhand der analysierten Tumore ergaben damit nur geringfügige Unterschiede. Hinsichtlich der Markermoleküle für die Invasion war nur der EGF-Rezeptor in den Cx43-Tumoren hochreguliert.

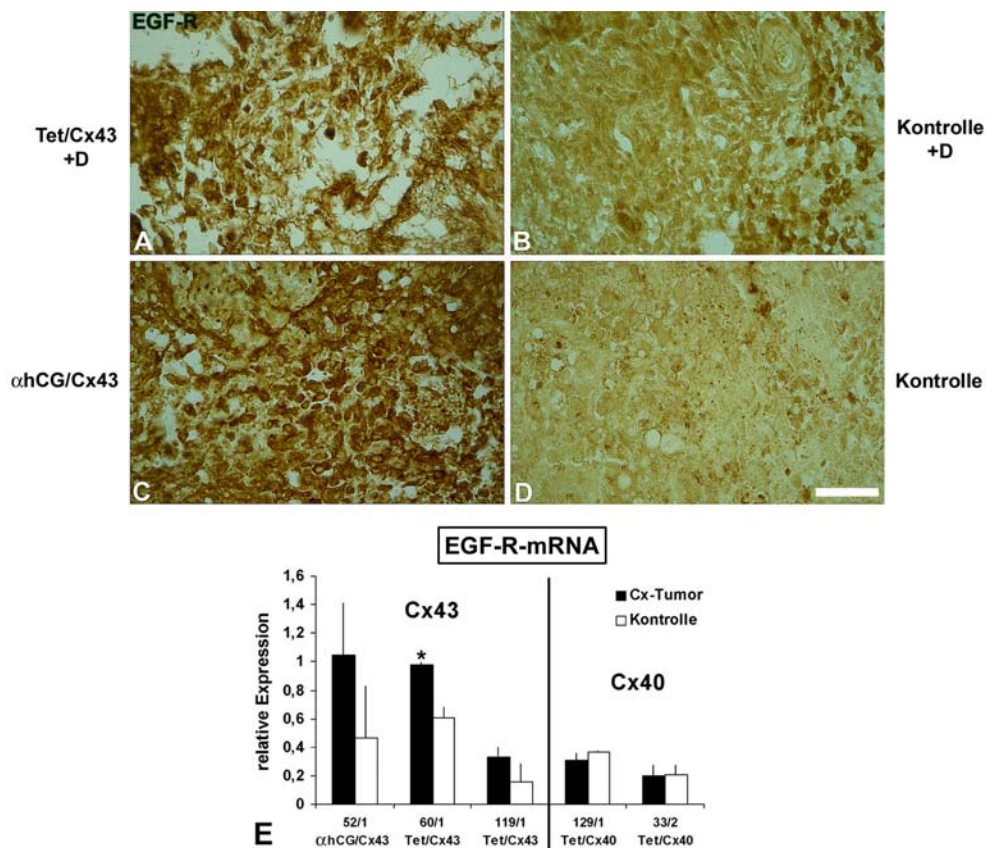


Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis des EGF-Rezeptors (EGF-R) in Cx43-Tumoren. (A) Tet/Cx43/#36-Tumor +D, (C) α hCG/Cx43/#2-Tumor und entsprechende Vektorkontrollen (= Kontrolle) zu (A, C) in (B, D). Die Cx43-Tumore (A, C) wiesen eine stärkere Expression des EGF-Rezeptors im Vergleich zu den entsprechenden Vektorkontrollen (B, D) auf. +D: + Dox. Balken: 40 μ m. (E) Semiquantitative RT-PCR der EGF-R-Expression in repräsentativen induzierten Cx43- und Cx40-Tumoren im Vergleich zu den entsprechenden Vektorkontrollen (= Kontrolle). Dargestellt ist die relative EGF-Rezeptor-Expression nach dem Abgleich gegen β -Aktin. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Dox-induziertem Tumor und Vektorkontroll-Tumor.

4.4.3 Analyse des Tumorwachstums *in vivo*

In weiteren Untersuchungen wurde das Wachstumsverhalten der Cx-Transfektanten *in vivo* anhand der Tumorumfänge und der daraus ermittelten Wachstumskurven analysiert (siehe 3.7.1). In Tabelle 7 (Anhang 8.2) ist eine Übersicht über die Tumorentwicklung der eingesetzten Jeg3-Cx-Transfektanten in der Nacktmaus und ein Vergleich der Tumorumfänge nach Versuchsende zwischen Cx-Transfektante und Vektorkontrolle dargestellt. Zu Beginn der Versuche wurden auch uninduzierte Tet-Zellklone als zusätzliche Kontrolle auf ihr Tumorwachstum in der Nacktmaus untersucht. Da jedoch das stark heterogene Tumorwachstum in den Nacktmäusen ein sehr großes Problem darstellte, wurden die Versuche mit den uninduzierten Transfektanten nur an einigen ausgewählten Klonen getestet (siehe Tab. 7, Anhang 8.2). Die Ergebnisse der Nacktmausversuche zeigten in der Übersicht, daß es in einigen Mäusen teilweise zu gar keinem Tumorwachstum oder zu einer einseitigen Tumorbildung in einer der beiden Flanken kam (Tab. 7, Anhang 8.2). Je nach Versuchsansatz wiesen 0-22% aller analysierten Mäuse keine Tumorbildung auf, während 8-54% nur eine einseitige Tumorbildung zeigten. Dabei war keine Korrelation zu bestimmten Cx-Transfektanten erkennbar. Jedoch überwogen die Tiere, die nur den Vektorkontroll-Tumor bildeten (19% aller Mäuse). 6% der untersuchten Mäuse zeigten dagegen nur eine Tumorbildung mit der Cx-Transfektante. Aufgrund der starken Schwankungen im Tumorwachstum in den einzelnen Gruppen (Cx-Zellklon, Vektorkontrolle) wurden Wachstumskurven mit Einzelvergleichen der Tumorumfänge jeweils in einem Tier zwischen den beiden Klonen (Cx-Transfektante und Vektorkontrolle) aufgestellt und nur die Tumorumfänge der Tiere ausgewertet, die eine beidseitige Tumorbildung aufwiesen. Diese Einzelvergleiche werden im folgenden an ausgewählten Transfektanten exemplarisch aufgezeigt.

Bei der Analyse der induzierten Tet/Cx43-Zellklone und der α hCG/Cx43-Transfektante konnte eine eindeutige Reduktion im Tumorwachstum gegenüber der Vektorkontrolle beobachtet werden (Tab. 7, Anhang 8.2; Abb. 18A; Abb. 25A, D). In 73-100% der Gesamtzahl der Cx43-Tumore (100%: Tet/Cx43/#48 +D; 73%: Tet/Cx43/#36 +D) je nach Cx-Transfektante war das Tumorumfang am Versuchsende im Vergleich zur Vektorkontrolle reduziert. Abbildung 25A zeigt die Wachstumskurven der induzierten Jeg3-Tet/Cx43/#36-Transfektante anhand von repräsentativen Experimenten an 5 Mäusen. Es war deutlich das geringere Wachstum der dargestellten Cx43-Transfektante im Gegensatz zur höheren Wachstumsrate der Kontrolle zu erkennen. Der Vergleich der Tumorumfänge am Versuchsende zeigte je nach Experiment eine 1,2-5,6fache Reduktion in den Cx43-Tumoren. Hier konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Stärke der Cx43-Expression im Tumor und der Stärke der Tumorreduktion beobachtet werden (siehe Abb. 19, 20). Nicht induzierte Cx43-Zellklone zeigten tendenziell eher ein verstärktes Tumorwachstum im

Vergleich zur Vektorkontrolle (Abb. 25B). In der Abbildung 25C sind die Wachstumskurven der induzierten Tet/Cx43/#36-Transfektante (n=8) versus uninduziertem Zellklon (n=6) dargestellt. Auch hier konnte ein reduziertes Tumorstadium (50%ige Reduktion am Versuchsende) der induzierten versus uninduzierten Cx43-Transfektante nachgewiesen werden. Die Wachstumskurven der Jeg3- α hCG/Cx43-Transfektante versus Vektorkontrolle zeigt Abbildung 25D. Hier wies der Klon Jeg3- α hCG/Cx43/#2 wie auch die induzierten Tet/Cx43-Zellklone ein stark reduziertes Tumorstadium im Vergleich zur Vektorkontrolle in derselben Maus auf. Das Tumorstadium am Versuchsende war je nach Experiment 3,4-27fach reduziert. Auch hier konnte keine direkte Korrelation zwischen der Cx-Expressionsstärke und der Stärke der Reduktion des Tumorstadiums detektiert werden (siehe Abb. 19, 20).

Ein Vergleich der relativen Tumorstadien der einzelnen Cx-Transfektanten versus Vektorkontrolle am Versuchsende bestätigte die Tumorstadiumreduktion der Cx43-Transfektanten (Abb. 26A). Bei dieser Auswertung wurden nur die induzierten Cx-Zellklone analysiert. Das Tumorstadium der Vektorkontrolle wurde dabei als 100% gesetzt und jeweils der prozentuale Wert des entsprechenden Tumors der Cx-Transfektante berechnet. Die Werte der Tumore des Cx-Transfektanten wurden gemittelt und im Vergleich zur Vektorkontrolle graphisch dargestellt. Zu beachten waren hierbei die hohen Standardabweichungen bedingt durch das stark heterogene Tumorstadium. In Abbildung 26A ist das prozentuale Verhältnis der Tumorstadien der Cx43-Transfektanten versus der Vektorkontrolle gezeigt. Alle für diese Analyse ausgewählten Cx43-Tumore wiesen eine signifikante Reduktion im Tumorstadium am Versuchsende auf. Bei den Tet/Cx43-Transfektanten wies der Klon #36 im Mittel eine 64%ige (n=8), Klon #20 eine 65%ige (n=7) und Klon #48 eine 92%ige (n=3) Reduktion des Tumorstadiums gegenüber der Vektorkontrolle auf. Die α hCG/Cx43/#2-Transfektante zeigte eine Reduktion des Tumorstadiums im Durchschnitt von 86% (n=10). Ein anderes Wachstumsverhalten *in vivo* war in den induzierten Cx40- und trCx43-Transfektanten zu erkennen (Tab. 7, Anhang 8.2; Abb. 25E, F). Hier waren nur in 25-33% der Gesamtzahl der induzierten Cx40-Tumore (Klon #13 und #19) die Tumorstadien im Vergleich zur Vektorkontrolle reduziert (Tab. 7, Anhang 8.2). Es konnte im Vergleich zur Vektorkontrolle kein deutlich reduziertes Tumorstadium und keine Korrelation zur Cx-Transfektion nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Tet/Cx40- und Tet/trCx43-Tumore zeigten ein tendenziell stärkeres Wachstum gegenüber den Vektorkontroll-Tumoren (Abb. 26B, C; Tab. 7, Anhang 8.2).

Zusammenfassend korrelierten die Ergebnisse der Analyse des Tumorstadiums der Zelltransfektanten *in vivo* in der Nacktmaus, trotz der individuellen Schwankungen der Tumorstadien zwischen den Tieren, mit den Resultaten des *in vitro*-Wachstums. Die Cx43-Transfektanten zeigten auch *in vivo* ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zur

Vektorkontrolle und zum uninduzierten Zellklon. Dagegen wiesen die Cx40- und trCx43-Transfektanten kein eindeutig reduziertes Tumorstadium, sondern zum Teil ein verstärktes Wachstum auf. In weiteren Versuchen soll die Zellproliferationsrate der Tumore mit Hilfe der Ki67-Färbung analysiert werden, um zu klären, ob die Reduktion des Tumorstadiums durch eine Reduktion der Proliferation oder nur durch eine geringere Ansammlung von Blut im Tumor zustande kommt.

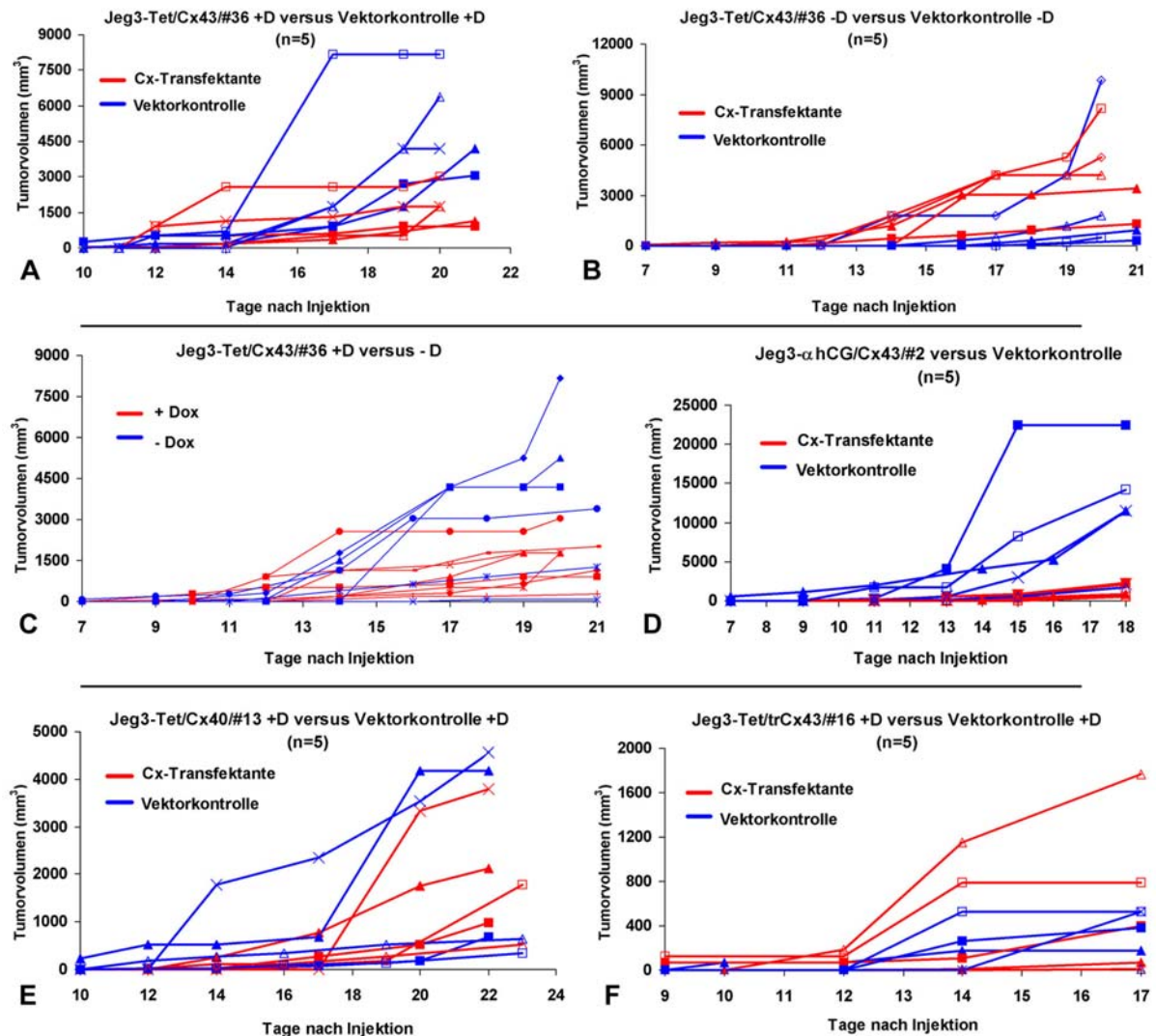


Abb. 25: Wachstumskurven der Jeg3-Cx-Transfektanten in der Nacktmaus. Die Kurven zeigen Einzelvergleiche der Tumorstadien jeweils in einem Tier zwischen der Cx-Transfektante und der Vektorkontrolle (A, B, D, E, F). In (C) ist der Vergleich der Wachstumskurven von einem induzierten und uninduzierten Zellklon dargestellt. Es sind jeweils Einzelvergleiche in fünf repräsentativen Mäusen (n=5) abgebildet (in (C) +D (n=8) und -D (n=6)). Rot repräsentiert die Cx-Transfektante und blau die Vektorkontrolle (in (C) rot: +Dox, blau: -Dox). Gleiche Symbole zeigen jeweils das Wachstum in derselben Maus. Die Wachstumskurven geben das Tumorstadium in mm³ vom ersten Tag der Tumordetektion bis zum Versuchsende wieder. (A) Tet/Cx43/#36 +Dox, (B) Tet/Cx43/#36 -Dox, (C) Tet/Cx43/#36 + versus -Dox, (D) αhCG/Cx43/#2, (E) Tet/Cx40/#13 +Dox, (F) Tet/trCx43/#16 +Dox. Die Analyse des Tumorstadiums *in vivo* zeigte, daß die Cx43-Transfektanten ein reduziertes Wachstum im Vergleich zu den Vektorkontroll-Zellen aufwiesen, während die Cx40- und trCx43-Transfektanten keine eindeutige Tumorstadiumsreduktion erkennen ließen. +D: +Dox, -D: -Dox.

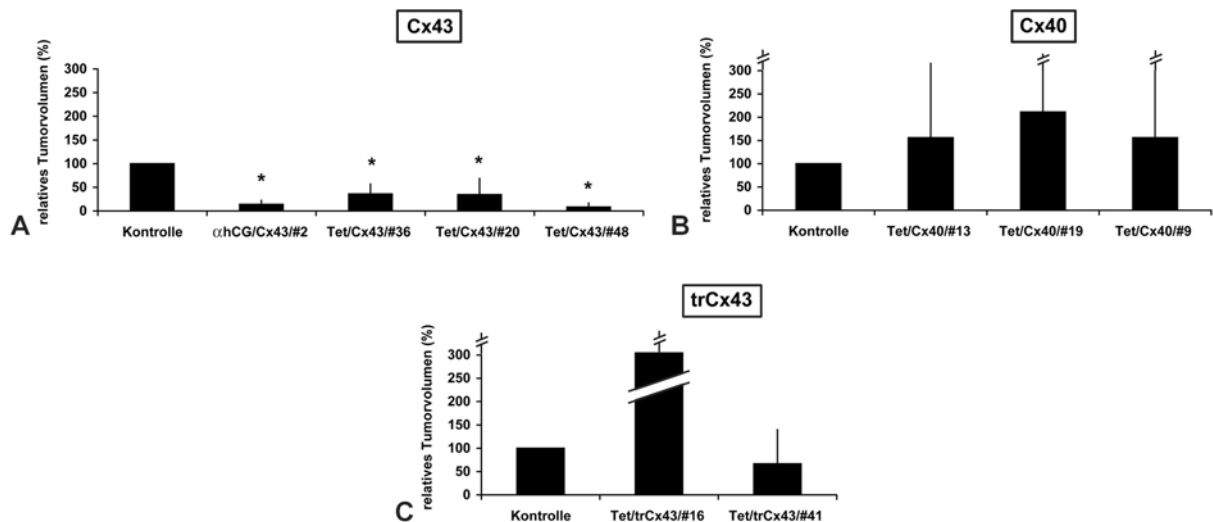


Abb. 26: Graphische Darstellung der relativen Tumorumfänge der induzierten Cx43-, Cx40- und trCx43-Transfektanten und des α hCG/Cx43/#2-Zellklons im Vergleich zur Vektorkontrolle am Versuchsende. Das Tumorumfang der Vektorkontrolle (= Kontrolle) wurde als 100% gesetzt und jeweils der prozentuale Wert des entsprechenden Tumors der Cx-Transfektante berechnet. **(A)** Cx43-Tumore: α hCG/Cx43/#2 (n=10), Tet/Cx43/#36 (n=8), Tet/Cx43/#20 (n=7) und Tet/Cx43/#48 (n=3). **(B)** Cx40-Tumore: Tet/Cx40/#13 (n=8), Tet/Cx40/#19 (n=8) und Tet/Cx40/#9 (n=4). **(C)** trCx43-Tumore: Tet/trCx43/#16 (n=7) und Tet/trCx43/#41 (n=4). Im Vergleich zur Reduktion des Tumorumfanges der Cx43-Transfektanten gegenüber der Vektorkontrolle zeigten die Cx40- und trCx43-Transfektanten z.T. sogar ein verstärktes Wachstum. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen induzierten Cx43-Tumoren bzw. α hCG/Cx43/#2-Tumoren und den Vektorkontroll-Tumoren.

4.5 Gene-Array-Analysen zur Bestimmung der Genexpressionsmuster in Jeg3-Cx-Transfektanten

Um zu untersuchen, welche Gene mit dem unterschiedlichen zellphysiologischen Verhalten der verschiedenen Jeg3-Cx-Transfektanten in Zusammenhang stehen könnten, wurden Genexpressionsanalysen mit Hilfe von Gene-Arrays durchgeführt. Ziel war es, die Cx-vermittelte Signalkaskade, die zu einem reduzierten Proliferations- und Wachstumsverhalten der Jeg3-Cx43-Transfektanten gegenüber den Cx40- und trCx43-Transfektanten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt, aufzuklären.

Zur Durchführung der cDNA-Expressionsanalysen wurde der Gene-Array HG_U95Av2 von Affymetrix verwendet. Dieser Array umfaßt cDNA's von ca. 6000 humanen Genen und ca. 6000 EST's (*expressed sequence tags*). Die auf der Glasoberfläche der Arrays immobilisierten cDNA-Fragmente sind zwischen 35 und 200 bp lang und enthalten in der Regel die 3'-untranslatierende Region (3'-UTR). Die auf dem Array repräsentierten Gene können in folgende funktionelle Gruppen eingeteilt werden: u.a. Transkriptionsfaktoren / Signalmoleküle, Adhäsionsmoleküle, immunologische Faktoren, Onkogene, Hormone, Wachstumsfaktoren, metabolische Enzyme, Apoptose regulierte Gene, Zellzyklus-Gene, extrazelluläre Matrixmoleküle und Zytoskelett assoziierte Proteine.

Für die Gene-Array-Analyse wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen der Jeg3-Cx-Transfektanten mit nachfolgendem DNase-Verdau zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen isoliert und 10 µl RNA-Probe eingesetzt (siehe 3.3.5.2).

Dafür wurden jeweils drei Klone der Cx43- (Klone #20, #36 und #48), Cx40- (Klone #9, #13 und #19) und trCx43- (Klone #16, #37 und #41) Transfektanten und ein Klon der α hCG/Cx43-Transfektanten (Klon #2) eingesetzt. Es wurden vergleichende Analysen der cDNA-Expressionsmuster der Tet-Zellklone jeweils vor und nach 48 h Induktion mit Dox durchgeführt. Das Expressionsmuster der Transfektante α hCG/Cx43/#2 wurde mit der entsprechenden Vektorkontrolle verglichen. Zunächst wurden die Genexpressionsmuster in Paarvergleichen der einzelnen Klone, d.h. jeder Zellklon induziert (+ Dox) versus uninduziert (- Dox) bzw. der Klon α hCG/Cx43/#2 versus Vektorkontrolle, aufgestellt. Die Genexpression von jedem Zellklon wurde dabei zuerst getrennt untersucht. Ferner wurden im folgenden multiple Paarvergleiche der Tet-Transfektanten angefertigt (siehe 4.5.3).

4.5.1 Hierarchische Cluster-Analysen der Genexpressionsmuster

Die hierarchische Cluster-Analyse dient der Identifizierung von Gengruppen (Cluster von Genen), die in den verschiedenen experimentellen Ansätzen ähnlich reguliert sind und somit für eine Gruppe (z.B. Zelltyp oder experimentellen Ansatz) spezifisch sind. Ziel ist es, aufgrund der Detektion solcher Gencluster, mögliche phylogenetische Gruppen mit einem ähnlichen Genexpressionsmuster zwischen verschiedenen Versuchsansätzen in einem Dendrogramm aufzuzeigen.

Für die hierarchischen Cluster-Analysen wurden noch zwei weitere Tet/Cx43-Klone (Klone #35 und #37) und Tet/Cx40-Klone (#50 und #52) miteinbezogen.

Es wurden zuerst Cluster-Analysen von 3 Cx40-Transfektanten und 5 Cx43-Transfektanten induziert versus uninduziert durchgeführt. Zusätzlich wurde der Zellklon α hCG/Cx43/#2 und die entsprechende Vektorkontrolle mit analysiert (Abb. 27A). In allen Cluster-Analysen wurde mindestens ein *present call* für ein Gen pro experimenteller Gruppe und eine Änderung der Genexpression von 2 (*fold change*) vorausgesetzt. Das Dendrogramm zeigte nach dem hierarchischen Clustering von 6128 Genen zwei Hauptverzweigungen, die in zwei distinkten Subgruppen mit unterschiedlichen Genexpressionsmustern resultierten, eine Gruppe mit den Cx40-Transfektanten und eine Gruppe, die die Cx43-Zellklone enthielt. In rot waren die hochregulierten, in grün die herunterregulierten und in schwarz die nicht regulierten Gene dargestellt. Jedoch konnte keine dritte Gruppe, die aus den uninduzierten Zellklonen bzw. der Vektorkontrolle bestand, nachgewiesen werden. Es zeigte sich immer die größte Ähnlichkeit im Genexpressionsmuster zwischen einer Transfektante, die das jeweilige Connexin exprimiert, und der gleichen Transfektante im uninduzierten Zustand. D.h. es wurden nur sehr wenige Gene durch die Induktion des Connexin-Gens verändert. Diese

wenigen Genunterschiede zwischen induziertem und uninduziertem Zustand waren in der Cluster-Analyse nicht sichtbar, bzw. führten nicht zu einer Gruppenbildung zwischen induzierten und uninduzierten Transfektanten. Jedoch kam es zu einer deutlichen Aufzweigung in Cx40- und Cx43-Transfektanten. D.h. die Genexpressionsunterschiede zwischen diesen beiden Gruppen führten zu einer Auftrennung in zwei Subgruppen.

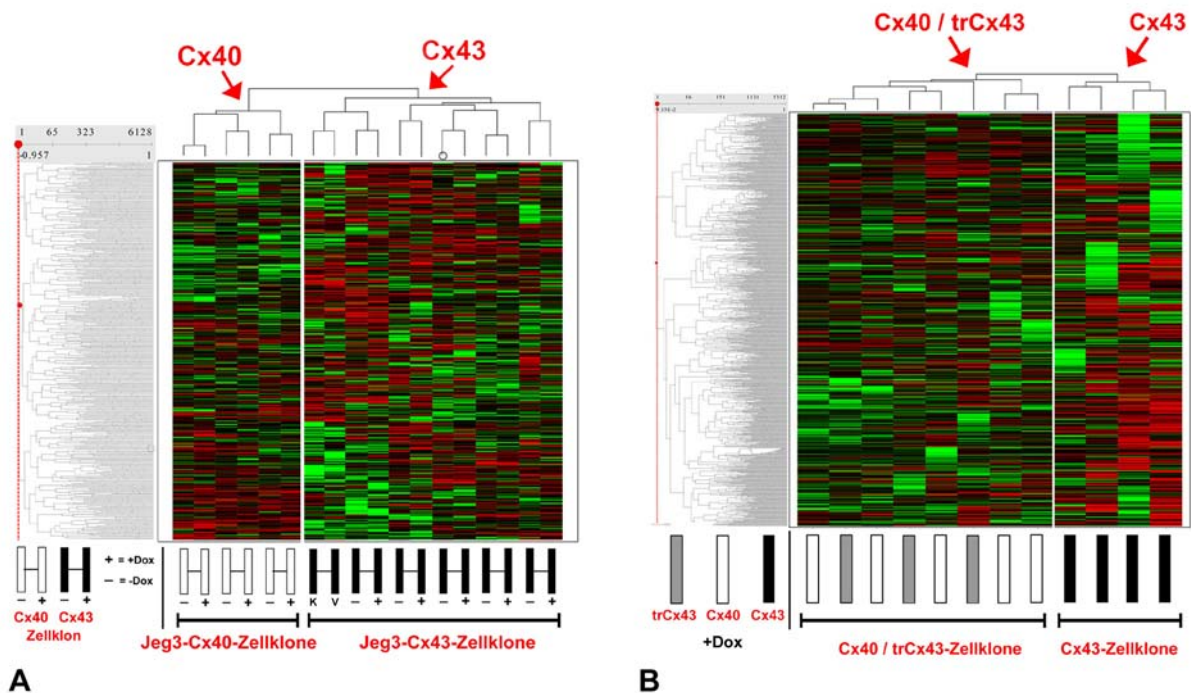


Abb. 27: Hierarchische Cluster-Analysen der Genexpressionsdaten von Jeg3-Cx-Transfektanten nach Gene-Array-Untersuchungen. Das hierarchische Clustering von Genen zeigte eine Einteilung der Transfektanten in distinkte Subgruppen. Die Signalstärken der einzelnen Gene aller Arrays wurden auf den Median normalisiert. In rot dargestellt sind die hochregulierten (4fache des Median), in grün die herunterregulierten (0,25fache des Median) und in schwarz (= Median) die nicht regulierten Gencluster. **(A)** Hierarchisches Clustering von 6128 selektierten Genen von 5 Cx43- und 3 Cx40-Transfektanten uninduziert und nach Induktion mit Dox. Zusätzlich wurde der Klon α hCG/Cx43/#2 (K) und die entsprechende Vektorkontrolle (V) mit in die Analyse einbezogen. **(B)** Hierarchisches Clustering von 5321 selektierten Genen von 4 induzierten Cx43-, 5 Cx40- und 3 trCx43-Transfektanten. Das hierarchische Clustering der Gene führte zu zwei Subgruppen bestehend aus Cx43- und Cx40-Zellklonen in (A) und Cx43- und Cx40- / trCx43-Transfektanten in (B). Induzierte und uninduzierte Zellklone zeigten keine Subgruppen-Bildung (A). Die trCx43-Transfektanten wiesen eine größere Ähnlichkeit mit den Cx40- als mit den Cx43-Transfektanten auf (B). (A) +: + Dox, -: - Dox.

Um zu evaluieren, ob die trCx43-Transfektanten eine eigene Subgruppe in der hierarchischen Cluster-Analyse bilden oder einen der beiden Gruppen mit den Cx43- und Cx40-Zellklonen zugeordnet werden, wurde eine Cluster-Analyse mit den Datensätzen der drei verschiedenen Cx-Transfektanten durchgeführt. Dazu gingen die Daten von 5312 selektierten Genen der Gene-Array-Untersuchung von 4 Tet/Cx43-, 5 Tet/Cx40- und 3 Tet/trCx43-Transfektanten nach der Induktion der Cx-Expression mit Dox in die Analyse ein (Abb. 27B). Es konnte wieder eine Bildung von zwei Gruppen mit ähnlichen Mustern der exprimierten Gene detektiert werden, eine Gruppe mit den Cx43-Transfektanten und eine

Gruppe, in der die Cx40-Zellklone zusammen mit den trCx43-Transfektanten ungeordnet vorlagen. Die trCx43-Transfektanten wiesen somit eher eine größere Ähnlichkeit im Genexpressionsmuster mit den Cx40-Zellklonen im Vergleich zu den Cx43-Transfektanten auf.

4.5.2 Expression von NOV, ZO-1 und Occludin in Einzel-Paarvergleichen

Da schon einige Gene bekannt waren, deren Produkte einen möglichen Einfluß auf die Funktion von Gap Junctions haben (siehe 1.1.3; 1.2), wurde zuerst die Expression dieser Gene mit Hilfe der Gene-Array-Analyse untersucht.

Zu diesen Genen zählt NOV, ein Wachstumsregulator-Protein der CCN-Familie (Joliot et al., 1992; Perbal, 2001). NOV konnte in Cx43-transfizierten C6-Gliomazellen, die auch eine Reduktion der Proliferation *in vitro* aufwiesen (Zhu et al., 1992), als hochreguliertes Gen mittels der *Differential Display*-Methode identifiziert werden (Gupta et al., 2001). Die Tight Junction-Proteine ZO-1 und Occludin waren deshalb besonders interessant, weil Kollokalisierungen von Tight Junction- und Gap Junction-Proteinen beschrieben wurden (Kojima et al., 1996). Cx32 interagiert vermutlich über den C-Terminus mit dem Membranprotein Occludin (Kojima et al., 1999, 2002). Ferner konnte auch eine Interaktion zwischen dem C-Terminus von Cx43 und dem peripheren Membranprotein ZO-1 in Cx43-Transfektanten, in Fibroblasten und in Herzmyozyten nachgewiesen werden (Giepmans und Moolenaar, 1998; Toyofuku et al., 1998).

Daher wurde zunächst die Expression von NOV, ZO-1 und Occludin in den Einzel-Paarvergleichen von je drei Zellklonen der Cx43-, Cx40- und trCx43-Transfektanten, jeweils induziert (+ Dox) versus uninduziert (- Dox) überprüft. Ferner wurde die Transfektante α hCG/Cx43/#2 mit der entsprechenden Vektorkontrolle verglichen.

Es konnten im Durchschnitt ungefähr 5000 Gene / EST's der ca. 12000 auf dem Gene-Array enthaltenden Gene in den untersuchten Jeg3-Cx-Transfektanten, sowohl induziert als auch uninduziert, als exprimiert (*detection call = present*) detektiert werden. In der vergleichenden Analyse der einzelnen Zellklone zeigte sich jedoch, daß nur sehr wenige Gene übereinstimmend reguliert waren, d.h. daß die Expression des Gens statistisch als erhöht (*increased*) oder erniedrigt (*decreased*) ermittelt wurde. Nach der Festlegung des Filters für die Änderung der Genexpression von 1,5 (*fold change*) waren im Mittel aller analysierten Jeg3-Cx-Zellklone ca. 60 Gene hoch- und 29 Gene herunterreguliert. Die Wahl des Wertes 1,5 für die Änderung der Genexpression ist in der Literatur anerkannt (Yue et al., 2001). Nach einem weiteren Filterprozeß durch die Einbeziehung des *change p-values*, einem Wahrscheinlichkeitswert für die Änderung der Genexpression, waren nur noch im Durchschnitt ca. 37 Gene hoch- und 17 Gene herunterreguliert. Es konnte jedoch kein einheitliches Muster der Expression von Genen in den Einzel-Paarvergleichen der

Transfektanten eines Cx-Konstruktes identifiziert werden. Eine Überprüfung der Expression der jeweiligen transfizierten Connexine in den Transfektanten konnte mit der Gene-Array-Analyse nicht durchgeführt werden, da die transfizierten cDNA-Konstrukte den auf den *probe sets* enthaltenden Bereich der Cx-Sequenz (in der Regel die 3'-UTR) nicht enthielten.

Bei der Analyse der Expression von NOV, ZO-1 und Occludin zeigte sich keine signifikante Änderung der Genexpression im *change call* in allen untersuchten Cx-Transfektanten. Diese Gene wurden in der Gene-Array-Analyse im *detection call* von der Array-Software in den meisten Fällen als nicht exprimiert detektiert.

Jedoch konnte man anhand der Daten der Gene-Array-Analyse dieser Gene Tendenzen zur Hoch- oder Herunterregulation finden, wenn diese auch nicht statistisch abgesichert werden konnten. In Tabelle 4 sind die Daten der Änderung der Genexpression von NOV, ZO-1 und Occludin in den Einzel-Paarvergleichen der untersuchten Jeg3-Cx-Transfektanten dargestellt. Es zeigte sich, daß NOV in den induzierten Jeg3-Cx43-Transfektanten 1,4 bis 1,7fach je nach Zellklon hochreguliert wurde. Die Cx40-Transfektanten wiesen nach Dox-Induktion dagegen eine 1,1 bis 1,9fache Herunterregulation von NOV auf, während in den trCx43-Transfektanten keine eindeutige Tendenz in eine Richtung zu erkennen war. Beim Vergleich der Signalstärken der Cx43-Transfektanten im Mann-Whitney-Signifikanztest (in diesen Test gehen nur die Signalgrößen unabhängig vom *detection / change call* und dem *change p-value* ein) zeigte sich zwar keine Signifikanz, jedoch konnte auch eine im Mittel 2,8fach erhöhte Signalstärke in den drei induzierten gegenüber den uninduzierten Cx43-Transfektanten ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von ZO-1 wurde in allen Transfektanten 1,2 bis 2,7fach herunterreguliert (Tab. 4). Auch der Vergleich der Signalstärken im Mann-Whitney-Test zeigte bei den Cx43- und Cx40-Zellklonen eine im Durchschnitt 2,5 bis 4fach erniedrigte Expression von ZO-1, die jedoch nicht signifikant war (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von Occludin wies dagegen eher eine Erhöhung in den Cx43- und Cx40-Transfektanten auf (Tab. 4). Alle Cx40-Transfektanten zeigten eine 1,1 bis 3,8fache Hochregulation der Occludin-Expression, während bei den Cx43-Transfektanten nur 2 von 3 Zellklonen eine 4,3 bis 5,4fache Hochregulation aufwiesen. Die trCx43-Transfektanten zeigten keine Regulation der Occludin-Expression.

Da die Unterschiede in der NOV-, ZO-1- und Occludin-Expression in den Jeg3-Cx-Transfektanten möglicherweise zu schwach waren, um in der Gene-Array-Analyse die Filterprozesse zu passieren, sollte mit Hilfe der sensitiveren semiquantitativen RT-PCR die Expression der drei Gene im folgenden überprüft werden (siehe 4.6).

Tab. 4: Vergleichende Analyse der Genexpression von NOV, ZO-1 und Occludin in Dox-induzierten versus uninduzierten Cx43-, Cx40- und trCx43-Transfektanten. Gene-Array-Analysen. Der Klon α hCG/Cx43/#2 wurde mit der Vektorkontrolle verglichen. Angaben der Änderung der Genexpression (*fold change*); \uparrow Tendenz zur Hochregulation, \downarrow Tendenz zur Herunterregulation.

Gen-Bezeichnung Genbank-Nummer	Cx-Transfektanten		
NOV (Wachstumsregulator der CCN-Familie) X96584	Cx43/#20 1,4 \uparrow	Cx43/#36 1,7 \uparrow	α hCG/Cx43/#2 1,5 \uparrow
	Cx40/#9 1,9 \downarrow	Cx40/#13 1,1 \downarrow	Cx40/#19 1,3 \downarrow
	trCx43/#16 4,3 \uparrow	trCx43/#37 1,8 \downarrow	trCx43/#41 2 \uparrow
ZO-1 (Tight Junction-Protein) L14837	Cx43/#20 1,3 \downarrow	Cx43/#36 1,5 \downarrow	Cx43/#48 2 \downarrow
	Cx40/#9 2,7 \downarrow	Cx40/#13 2,4 \downarrow	Cx40/#19 2,2 \downarrow
	trCx43/#16 1,2 \downarrow	trCx43/#37 1,3 \downarrow	trCx43/#41 1,4 \downarrow
Occludin (Tight Junction-Protein) U49184	Cx43/#20 4,3 \uparrow	Cx43/#36 5,4 \uparrow	Cx43/#48 1,2 \downarrow
	Cx40/#9 1,1 \uparrow	Cx40/#13 3,8 \uparrow	Cx40/#19 1,4 \uparrow
	trCx43/#16 1,2 \downarrow	trCx43/#37 1 \downarrow	trCx43/#41 1,1 \uparrow

4.5.3 Unterschiede in der Genexpression ermittelt durch multiple Paarvergleiche

Für die multiplen Paarvergleiche wurden Kreuzvergleiche der Genexpression zwischen den drei Tet-Zellklonen eines Cx-Konstruktes (Cx43: Klone #20, #36 und #48, Cx40: Klone #9, #13 und #19 und trCx43: Klone #16, #37 und #41) mit je 9 Vergleichen angefertigt. Folgende 6 experimentelle Gruppen wurden gebildet und ausgewertet: Cx43 + versus – Dox, Cx40 + versus – Dox, trCx43 + versus – Dox, Cx43 + versus Cx40 + Dox, Cx43 + versus trCx43 + Dox und Cx40 + versus trCx43 + Dox. Mit Hilfe der multiplen Paarvergleiche sollten durch die Erhöhung der Anzahl an Vergleichen die stärksten Genregulationen herausgefiltert werden und nach Möglichkeit eine größere Anzahl an übereinstimmenden Genen in den einzelnen Gruppen gefunden werden.

Bei den multiplen Paarvergleichen zwischen den induzierten und uninduzierten Cx43-, Cx40- und trCx43-Transfektanten (+ versus – Dox) wurde eine Änderung der Genexpression von 1,5 und der zusätzliche Filter des *change p-value* ($< 0,001$ bzw. $> 0,999$) eingesetzt (Tab. 5). Dieser Wert für die Änderung der Genexpression wurde festgelegt, weil bei einer *fold change* von 2-2,5 in nur ein bis zwei Vergleichen Gene reguliert waren. Bei den anderen Gruppen-Vergleichen wurde eine *fold change* von 2,5 gewählt, da dort Gene in mehr als drei Vergleichen eine Regulation aufwiesen und deshalb nur die stärksten Unterschiede herausgefiltert wurden (siehe Tab. 6). In Tabelle 5 und 6 sind einige Gene aufgeführt, die in

den meisten Vergleichen unter den verwendeten Filterbedingungen unterschiedlich exprimiert waren. Zudem wurde anhand von Literaturrecherchen die Gene ausgewählt, die zum einen mit der Trophoblast-Differenzierung und zum anderen mit der Interaktion mit Cx-Proteinen und mit Tumorgenese in Zusammenhang stehen. Dazu zählten Transkriptionsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle, Rezeptoren, Aktin bindende Proteine, Moleküle der extrazellulären Matrix usw. Alle weiteren regulierten Gene sind im Anhang (8.3; Tab. 8 und 9) zusammengefaßt.

Auf einige in der Tabelle 5 und 6 aufgelisteten Gene soll nun im folgenden kurz eingegangen werden: Die Paarvergleiche der Cx43-, Cx40- und trCx43-Transfektanten jeweils induziert versus uninduziert ergaben nur sehr wenige regulierte Gene (Tab. 5). Es konnten in nur 3-4 Vergleichen von 9 Vergleichen insgesamt übereinstimmend regulierte Gene in den einzelnen Gruppen detektiert werden, obwohl nur eine *fold change* von 1,5 gewählt wurde. Die Cx43-Transfektanten zeigten in 4 von 9 Vergleichen eine im Mittel 2,1fache Hochregulation von VE-Cadherin, einem endothelzellspezifischem Cadherin (Tab. 5A). Dieses Zelladhäsionsmolekül ist deshalb von Interesse, da Zytotrophoblastzellen während der Invasion in die Dezidua und in die Spiralarterien und dem Ersetzen von Endothelzellen einen vaskulären Phänotyp annehmen, der durch eine Expression von VE-Cadherin charakterisiert ist (Zhou et al., 1997). VE-Cadherin wurde auch in Jeg3-Zellen nachgewiesen. Die Cx40-Transfektanten wiesen in 3 von 9 Vergleichen im Mittel eine 3,7fach signifikante Hochregulation von PP11 (*placental protein 11*) auf (Tab. 5B). PP11 wird im Trophoblasten und im Chorionkarzinom exprimiert und scheint eine Rolle in der Karzinogenese zu spielen (Yudate et al., 1995). Die trCx43-Transfektanten, die das verkürzte Cx43 ohne den größten Teil des C-Terminus exprimieren, zeigten u.a in 3 Vergleichen eine bis zu 2,5fache Hochregulation von zwei Proteinen, die mit der Interaktion mit Connexinen in Zusammenhang stehen, Caveolin-2 und α -Tubulin (Tab. 5C). Caveolin-2 ist als integrales Membranprotein Bestandteil von vesikulären Invaginationen (Caveolae). Caveoline transportieren Lipide und Signalmoleküle in diese Caveolae und regulieren diese (Schubert et al., 2002). Schubert et al. (2002) konnten eine Interaktion von Connexinen mit Caveolin-1 nachweisen. Caveolin-2 zeigte außerdem eine signifikante Herunterregulation in 5 Vergleichen zwischen den induzierten Cx43- versus den trCx43-Transfektanten (Tab. 6B). Über α -Tubulin ist bekannt, daß es mit Cx43 über den C-Terminus interagiert und dies zu einer Regulation der Mikrotubulus-Stabilität in kommunizierenden Zellen führt (Giepmans et al., 2001a).

Die Analyse der Paarvergleiche der induzierten Cx-Transfektanten untereinander (Tab. 6) ergab eine größere Anzahl an Vergleichen mit übereinstimmenden Genen gegenüber den Paarvergleichen der induzierten versus uninduzierten Cx-Transfektanten (Tab. 5). In den induzierten Cx43-Transfektanten gegenüber den induzierten Cx40-Transfektanten war β -Catenin in 6 von 9 Vergleichen im Mittel 3,9fach signifikant hochreguliert (Tab. 6A). Das

Zelladhäsionsmolekül β -Catenin spielt u.a. in der terminalen Differenzierung des Trophoblasten eine Rolle (Getsios et al., 2001). Ai et al. (2000) konnten nachweisen, daß β -Catenin mit Cx43 in kultivierten Myozyten kolokalisiert ist. Dagegen konnte in den induzierten Cx40- versus trCx43-Transfektanten in 6 Vergleichen eine im Mittel 4,4fache signifikante Herunterregulation von β -Catenin gefunden werden (Tab. 6C).

Eine weitere Analyse und Überprüfung der in Tabelle 5 und 6 aufgelisteten Gene mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. In zukünftigen Versuchen sollen die Gene näher untersucht werden, die in mehr als 5 Vergleichen hoch- oder herunterreguliert waren. Es erfolgte eine Fokussierung in dieser Arbeit auf die Überprüfung der Expression von NOV, ZO-1 und Occludin vornehmlich aufgrund der Befunde aus der Literatur (siehe 4.5.2).

Tab. 5: Hoch- und herunterregulierte Gene in Cx43- (A), Cx40- (B) und trCx43-Transfektanten (C) + versus - Dox nach 9 multiplen Paarvergleichen der Gene-Array-Daten. Filter: *fold change*: > 1,5 bzw. < -1,5 und *change p-value*: < 0,001 bzw. > 0,999. Es sind jeweils die Anzahl der Vergleiche hoch- versus herunterreguliert und die Änderung der Genexpression (*fold change*) im Durchschnitt als xfach erhöht bzw. erniedrigt dargestellt. ↑ Hochregulation, ↓ Herunterregulation, dunkelgrau unterlegt: Gene, die im Mann-Whitney-Test signifikant reguliert waren ($p \leq 0,05$).

A Jeg3-Tet/Cx43 + versus - Dox			
Hochregulierte Gene			
Genbank-Nummer	Gen-Bezeichnung	9 Einzelvergleiche hoch- / herunterreguliert	<i>fold change</i>
X79981	VE-Cadherin	4/1	2,1 ↑
U67784	orphan G protein-coupled receptor (RDC1)	3/0	23 ↑
AA131149	similar to S100 calcium-binding protein P, EST	3/1	2 ↑
Herunterregulierte Gene			
M26683	interferon gamma treatment inducible protein	0/3	5,3 ↓
AJ237724	thiamine transporter (THTR-1)	0/3	4,1 ↓
B Jeg3-Tet/Cx40 + versus - Dox			
Hochregulierte Gene			
Y10313	IFRD1 (PC4) interferon-related developmental regulator	4/0	1,9 ↑
X13589	aromatase (estrogen synthetase)	4/2	2,3 ↑
M32402	placental protein (PP11)	3/0	3,7 ↑
Herunterregulierte Gene			
X77956	Id1	2/5	3,5 ↓
X17620	Nm23 protein	0/3	1,9 ↓
C Jeg3-Tet/trCx43 + versus - Dox			
Hochregulierte Gene			
X76534	NMB, Neuromedin B	4/0	7,1 ↑
M13452	lamin A	3/0	2,5 ↑
AF035752	caveolin-2	3/0	2,1 ↑
X78565	tenascin-C	3/0	17,2 ↑
X01703	alpha-tubulin	3/1	2,5 ↑
Herunterregulierte Gene			
AA522530	HIF-1 responsive RTP801, EST	0/4	2 ↓
L22473	Bax alpha	2/4	2,5 ↓
L20826	I-plastin	0/3	1,9 ↓

Tab. 6: Hoch- und herunterregulierte Gene in Cx43- versus Cx40-Transfektanten + Dox (A), Cx43- versus trCx43-Transfektanten + Dox (B) und Cx40- versus trCx43-Transfektanten + Dox (C) nach 9 multiplen Paarvergleichen der Gene-Array-Daten. Filter: *fold change*: > 2,5 bzw. < -2,5 und *change p-value*: < 0,001 bzw. > 0,999. Es sind jeweils die Anzahl der Vergleiche hoch- versus herunterreguliert und die Änderung der Genexpression (*fold change*) im Mittel als x-fach erhöht bzw. erniedrigt dargestellt. ↑ Hochregulation, ↓ Herunterregulation, dunkelgrau unterlegt: Gene, die im Mann-Whitney-Test signifikant reguliert waren ($p \leq 0,05$).

A Jeg3-Tet/Cx43 + Dox versus Jeg3-Tet/Cx40 + Dox			
Hochregulierte Gene			
Genbank-Nummer	Gen-Bezeichnung	9 Einzelvergleiche hoch- / herunterreguliert	<i>fold change</i>
X87838	beta-catenin	6/0	3,9 ↑
L20826	I-plastin	6/0	2,9 ↑
L41162	collagen alpha 3 type IX (COL9A3)	6/0	3 ↑
AJ130718	glycoprotein-associated amino acid transporter y+LAT1	4/0	3,4 ↑
AA149644	similar to junctional adhesion molecule 3 (JAM3), EST	4/0	3,3 ↑
Herunterregulierte Gene			
AI417038	similar to effector-cell-protease receptor 1, EST	0/6	9 ↓
X76648	glutaredoxin	0/6	7,4 ↓
B Jeg3-Tet/Cx43 + Dox versus Jeg3-Tet/trCx43 + Dox			
Hochregulierte Gene			
D13305	brain cholecystikinin receptor	6/0	5,4 ↑
Z97632	similar to uterine bombesin receptor, BRS-3, EST	4/0	3,6 ↑
U26726	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2	4/0	13,5 ↑
Herunterregulierte Gene			
X77956	Id1	0/6	4,5 ↓
AF035752	caveolin-2	0/5	3,4 ↓
L10678	profilin II	0/4	5,2 ↓
C Jeg3-Tet/Cx40 + Dox versus Jeg3-Tet/trCx43 + Dox			
Hochregulierte Gene			
AI417038	similar to effector cell protease receptor 1, EST	9/0	22,7 ↑
AI796944	similar to HMBA-inducible (HIS1), EST	6/0	2,9 ↑
M57763	ADP-ribosylation factor (hARF6)	6/0	3,6 ↑
Herunterregulierte Gene			
L10678	profilin II	0/7	9,1 ↓
X87838	beta-catenin	0/6	4,4 ↓
U94905	diacylglycerol kinase zeta	0/5	2,8 ↓

4.6 Validierung der Gene, die auf eine differentielle Genexpression in den Gene-Arrays hinweisen

4.6.1 Untersuchung der Expression von Occludin und ZO-1 in Jeg3-Cx-Transfektanten

Da die Ergebnisse der Gene-Arrays zumindest Hinweise auf eine unterschiedliche Expression der beiden Tight Junction-Proteine Occludin und ZO-1 in den Jeg3-Cx-Transfektanten gaben (siehe Tab. 4), sollte das Expressionsmuster dieser beiden Gene mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR vor und nach 48 h Dox-Behandlung der Zellen überprüft werden. In der Abbildung 28A sind die Ergebnisse der Analyse der Occludin-mRNA-Expression in drei Tet/Cx43- und zwei Tet/Cx40-Transfektanten dargestellt. Die Gene-Arrays zeigten eine Tendenz zur Hochregulation in den induzierten Cx43- und Cx40-Klonen versus uninduzierten Zellen (Tab. 4). In der RT-PCR-Analyse dagegen wies nur der Klon

Tet/Cx43/#20 nach Dox-Induktion im Mittel eine signifikante 3,5fache Hochregulation von Occludin auf. Im Gene-Array zeigte dieser Zellklon im induzierten Zustand auch mit die stärkste Expression von Occludin (Tab. 4). Weder in den anderen beiden Cx43-Transfektanten noch in den zwei Cx40-Zellklonen war eine Regulation nach Dox-Gabe zu beobachten. Somit konnten die Tendenzen aus den Gene-Arrays nur zum Teil bestätigt werden.

Es konnte keine eindeutige Veränderung der ZO-1-mRNA-Expression in den Jeg3-Cx-Transfektanten nachgewiesen werden (Abb. 28B). Nur der Klon Tet/Cx43/#36 zeigte nach Dox-Induktion im Mittel eine 2fache Reduktion der ZO-1-Expression. Verglichen mit der Herunterregulation der ZO-1-Expression in den induzierten Cx43- und Cx40-Transfektanten im Gene-Array (Tab. 4), zeigten die untersuchten zwei Cx43-, Cx40- und trCx43-Klone in der RT-PCR keinen Unterschied in der Expression induziert versus uninduziert.

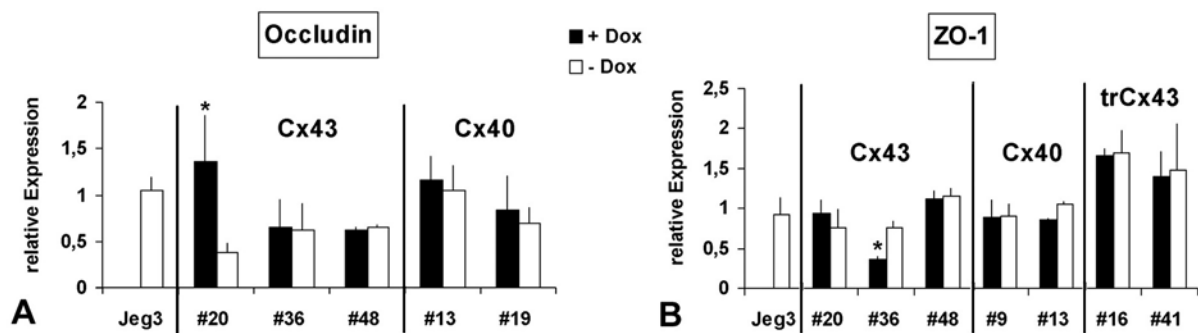


Abb. 28: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Occludin- (A) und ZO-1-Expression (B) in Tet/Cx43-, Tet/Cx40- und Tet/trCx43-Transfektanten vor und nach 48 h Dox-Induktion. Dargestellt ist die relative Expression von Occludin und ZO-1 nach dem Abgleich gegen β -Aktin. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Dox-behandelten (+ Dox) und unbehandelten Zellklonen (- Dox).

Im weiteren erfolgte eine Untersuchung der Protein-Expression von Occludin und ZO-1 in diesen Jeg3-Transfektanten mittels Immunhistochemie (Abb. 29). Sowohl die Cx-Transfektanten als auch die parentalen Jeg3-Zellen (nicht dargestellt) zeigten eine starke Expression von Occludin und ZO-1 an der Zellmembran. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Protein-Expression in den analysierten Zellklonen zwischen induziertem und uninduziertem Zustand gefunden werden. Auch der Klon Tet/Cx43/#20, der in der RT-PCR eine Hochregulation von Occludin nach Dox-Gabe aufwies, zeigte keine Veränderung der Protein-Expression induziert versus uninduziert (Abb. 29C, D). Ebenfalls war kein Unterschied in der Expression von ZO-1 in dem Zellklon Tet/Cx43/#36 nach Dox-Behandlung (Herunterregulation von ZO-1 in der RT-PCR) aufzuzeigen (Abb. 29E, F).

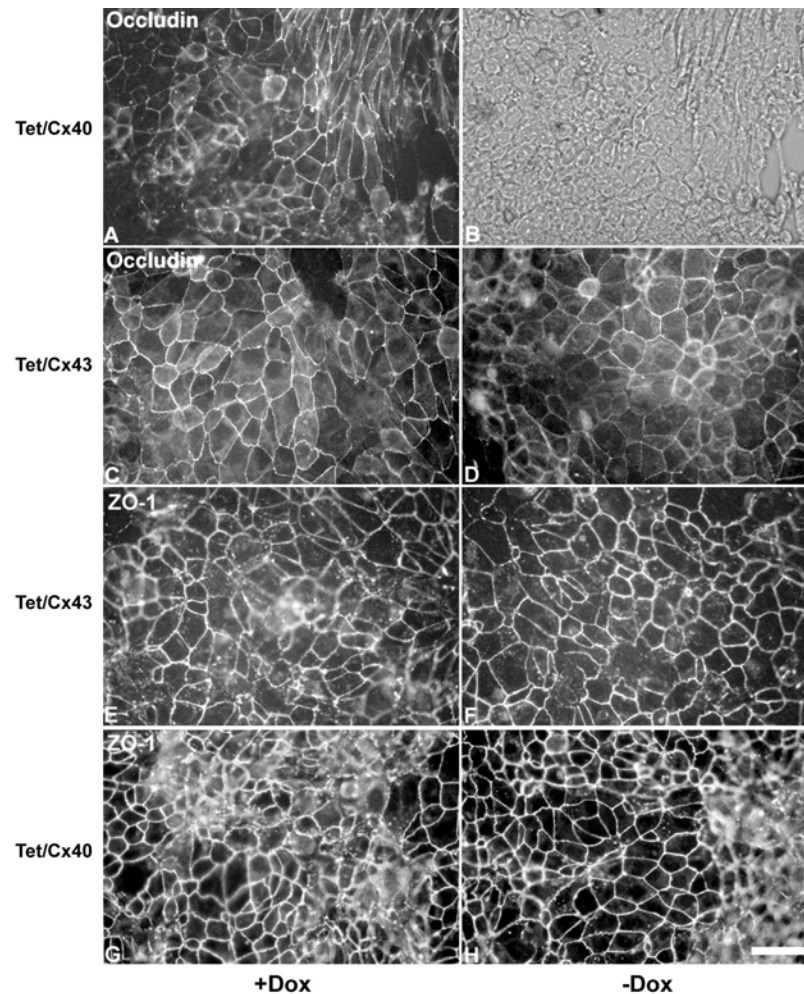


Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis von Occludin und ZO-1 in Tet/Cx43- und Tet/Cx40-Transfektanten vor und nach 48 h Dox-Induktion. (A, C-H) Fluoreszenzaufnahmen; (B) Phasenkontrastaufnahme. (A-D) Occludin-Färbung, (E-H) ZO-1-Markierung. (A, B) Tet/Cx40/#13, (C, D) Tet/Cx43/#20, (E, F) Tet/Cx43/#36, (G, H) Tet/Cx40/#13. Die beiden Tight Junction-Moleküle Occludin und ZO-1 zeigten eine starke Expression entlang der Zellmembran in allen dargestellten Zellklonen unabhängig von der Dox-Induktion und dem transfizierten Connexin. Balken: 40 µm.

4.6.2 Untersuchung der Expression von NOV

4.6.2.1 Analyse der Expression von NOV in Jeg3-Cx-Transfektanten

Da die Gene-Array-Analysen Tendenzen zu einer unterschiedlichen Expression von NOV in den Jeg3-Cx-Transfektanten zeigten (Tab. 4), wurde die Expression von NOV in der semiquantitativen RT-PCR ebenfalls überprüft.

Die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse von jeweils drei Tet/Cx43-, Tet/Cx40- und Tet/trCx43-Transfektanten wiesen eine signifikante Hochregulation von NOV in allen induzierten Cx43-Zellklonen auf (Abb. 30). Dabei wies Klon #36 nach Induktion mit Dox im Durchschnitt eine 2,6fache, Klon #20 eine 2,3fache und Klon #48 eine 1,9fache Erhöhung der NOV-mRNA-Expression gegenüber den uninduzierten Zellklonen auf. Auch die Jeg3- α hCG/Cx43/#2-Transfektante zeigte im Mittel eine 1,7fache signifikante Hochregulation von NOV im Vergleich zur Vektorkontrolle (nicht gezeigt). In den drei induzierten Tet/Cx43-Zellklonen

konnte auch eine signifikante Erhöhung des NOV-Expressionslevels im Vergleich zu den parentalen Jeg3-Zellen detektiert werden (vgl. Abb. 34A). Dagegen war die NOV-Expression in den Cx40-Transfektanten in zwei der drei analysierten induzierten Klone (#13 und #19) schwach, aber nicht signifikant gegenüber den uninduzierten Klonen herunterreguliert. Klon #9 wies keine Veränderung der NOV-Expression nach Dox-Induktion auf. Die Expression von NOV in den trCx43-Transfektanten zeigte insgesamt eine schwächere Expression, jedoch keine signifikante Regulation. Die Tendenzen der NOV-Expression aus den Gene-Arrays (siehe Tab. 4) konnten somit weitgehend mit Hilfe der sensitiveren RT-PCR-Analyse validiert werden.

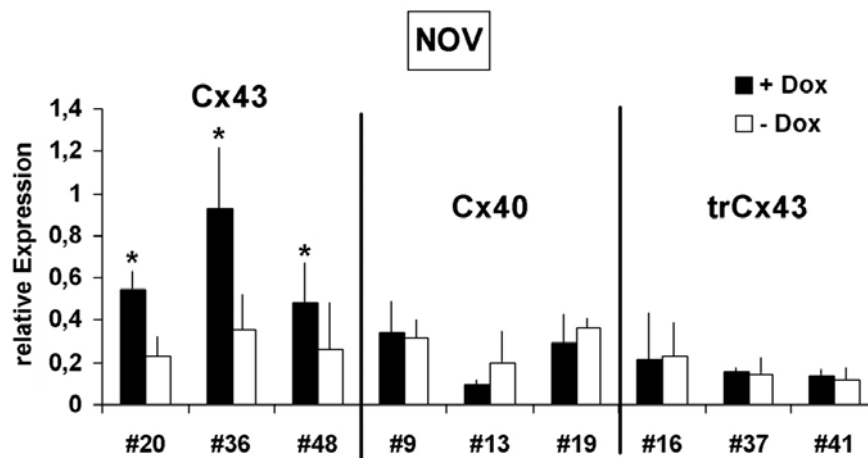


Abb. 30: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der NOV-Expression in Jeg3-Tet-Transfektanten vor und nach 48 h Dox-Induktion. Dargestellt ist die relative Expression von NOV nach dem Abgleich gegen β -Aktin. Es sind jeweils drei Tet/Cx43-, Tet/Cx40- und Tet/trCx43-Zellklone dargestellt. Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Hochregulation der NOV-Expression nach Dox-Induktion in den Cx43-Transfektanten im Vergleich zu den Cx40- und trCx43-Zellklonen. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=4). * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Dox-behandelten (+ Dox) und unbehandelten Zellklonen (- Dox).

4.6.2.2 Analyse der Expression von NOV in Jeg3-Cx-Tumoren

Um zu untersuchen, ob sich die NOV-Expression der Cx-Transfektanten *in vivo* in den Tumoren verändert, wurden Cx-Tumore auf die Expression von NOV ebenfalls in der RT-PCR analysiert. Diese Analyse zeigte tendenziell in den induzierten Jeg3-Cx-Tumoren eine ähnliche Regulation wie in den *in vitro*-Zellkulturen. In Abbildung 31 ist die NOV-Expression in zwei Tet/Cx43-Tumoren einer Zelltransfektante, in einem α hCG/Cx43-Tumor und zwei Tet/Cx40-Tumoren eines Zellklons gegenüber der entsprechenden Vektorkontrolle dargestellt. Zwei der Cx43-Tumore (Tumor 52/1 α hCG/Cx43; Tumor 60/1 Tet/Cx43 +D) zeigten eine 3,4fach erhöhte Expression von NOV im Vergleich zur Vektorkontrolle. Dagegen konnte in zwei induzierten Jeg3-Cx40-Tumoren keine Hochregulation von NOV detektiert werden. Hier war in den Vektorkontroll-Tumoren eine tendenziell stärkere Expression von

NOV zu beobachten. Die Analyse von 9 Cx43-Tumoren (n=15 Meßwerte) dreier Cx43-Klone (Tet/Cx43/#36, Tet/Cx43/#20 und α hCG/Cx43/#2) versus 6 Cx40-Tumoren (n=12 Meßwerte) von zwei Cx40-Transfektanten (Tet/Cx40/#13 und Tet/Cx40/#19) ergab im Mittel eine 2,6fach signifikante Erhöhung der NOV-Expression in den Cx43-Tumoren.

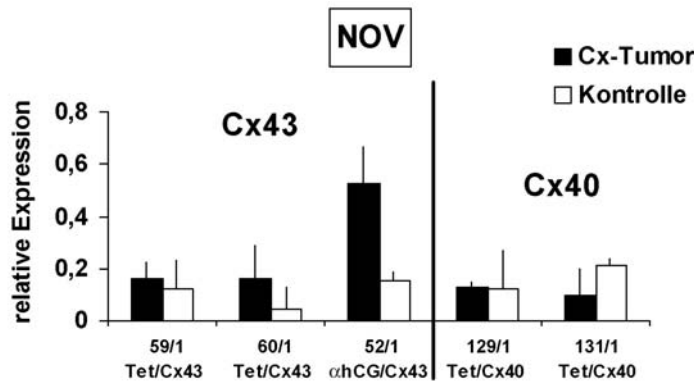


Abb. 31: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der NOV-Expression in Jeg3-Cx-Tumoren. Dargestellt ist die relative Expression von NOV in drei Cx43-Tumoren (59/1 und 60/1: Tet/Cx43/#36 + Dox; 52/1: α hCG/Cx43/#2) und zwei Cx40-Tumoren (129/1 und 131/1: Tet/Cx40/#13 + Dox) im Vergleich zu den entsprechenden Vektorkontroll-Tumoren (= Kontrolle) nach dem Abgleich gegen β -Aktin. Die Ergebnisse zeigten eine tendenziell stärkere Expression von NOV in den Cx43-Tumoren im Vergleich zu den entsprechenden Vektorkontrollen. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.6.2.3 Immunhistochemische Analyse der Expression und Lokalisation von NOV in Jeg3-Cx-Transfektanten

Um auch die Expression von NOV auf der Protein-Ebene in den Jeg3-Cx-Transfektanten zu bestätigen und dessen Lokalisation zu identifizieren, wurden immunhistochemische Analysen mit Hilfe des Laserscan-Mikroskops durchgeführt.

In Abbildung 32A, B ist die immunhistochemische Analyse der NOV-Expression in uninduzierten und induzierten Tet/Cx43-Transfektanten anhand eines repräsentativen Beispiels dargestellt. Die uninduzierten Tet/Cx43-Transfektanten (#20, #36 und #48) zeigten alle eine Lokalisation von NOV vorwiegend im Zellkern und z.T. im Zytoplasma (Abb. 32A). Nach Induktion der Cx43-Expression nach 48 h Dox-Gabe konnte eine starke NOV-Expression an der Zellmembran neben einer schwächeren Expression im Zellkern und Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 32B).

Die Koloalisation von NOV und Connexinen wurde mit Hilfe der Doppel-Immunfluoreszenz mit NOV- und Cx-Antikörpern untersucht. Die Abbildung 32G zeigt die Doppel-Immunfluoreszenz-Analyse von NOV und Cx43 in parentalen Jeg3-Zellen. In den parentalen Jeg3-Zellen konnte neben einem Fehlen der Cx43-Expression eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation von NOV nachgewiesen werden (Abb. 32G).

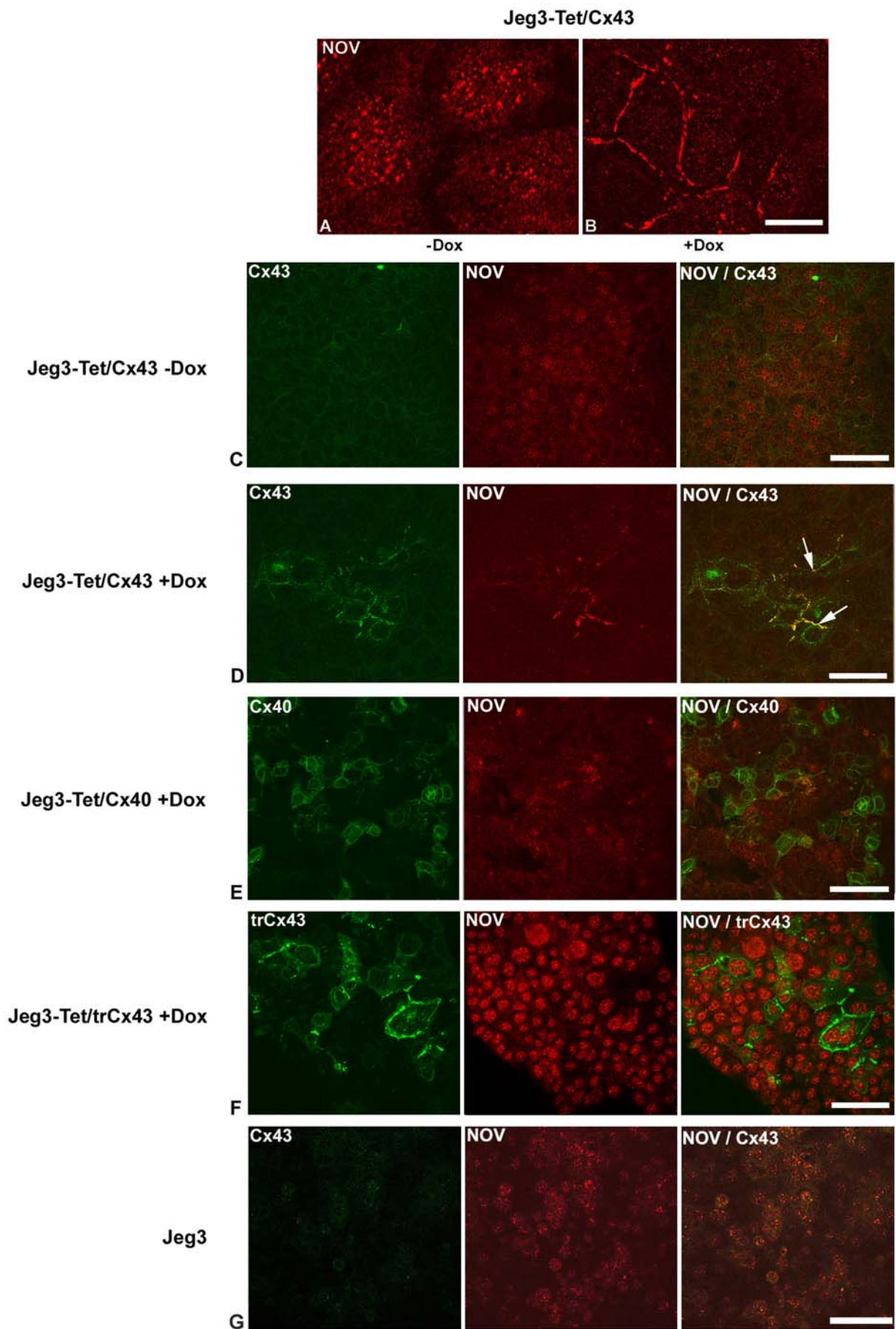


Abb. 32: Legende auf der nächsten Seite.

Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis von NOV in einer Tet/Cx43-Transfektante vor (-Dox) und nach 48 h Dox-Induktion (+Dox) (A, B). (Tet/Cx43/#36). In uninduzierten Zellen konnte eine NOV-Expression im Zellkern und im Zytoplasma detektiert werden (A). Nach Induktion mit Dox war dagegen eine starke NOV-Expression entlang der Zellmembran zu beobachten (B). Balken: 20 µm. **(C-G) Doppel-Immunfluoreszenzaufnahmen der Expression von NOV und Cx43 (C, D, G), NOV und Cx40 (E) und NOV und trCx43 (F) in Tet/Cx-Transfektanten.** Von links nach rechts: Cx-Markierung, NOV-Markierung und NOV/Cx-Doppelmarkierung. (C, D) NOV/Cx43-Immunfluoreszenz in der uninduzierten (-Dox) (C) und induzierten Tet/Cx43/#36-Transfektante (+Dox) (D). Nach Induktion der Cx43-Expression mit Dox war eine Kolokalisation von NOV und Cx43 an der Zellmembran zu beobachten (siehe Pfeile in (D)). (E) NOV/Cx40-Immunfluoreszenz in der induzierten Tet/Cx40/#13-Transfektante (+Dox). (F) NOV/trCx43-Immunfluoreszenz in der induzierten Tet/trCx43/#16-Transfektante (+Dox). (G) NOV/Cx43-Immunfluoreszenz in parentalen Jeg3-Zellen. Weder in der induzierten Cx40- (E) noch in der trCx43-Transfektante (F) konnte eine Kolokalisation von NOV und dem jeweiligem transfizierten Connexin detektiert werden. NOV war hier im Zellkern bzw. Zytoplasma exprimiert. Die parentalen Jeg3-Zellen zeigten auch eine NOV-Expression im Zellkern und im Zytoplasma (G). Balken: 80 µm.

In den Abbildungen 32C und D sind die immunhistochemischen Reaktionen der Doppel-Immunfluoreszenz von NOV und Cx43 in uninduzierten (Abb. 32C) und induzierten Cx43-Transfektanten (Abb. 32D) dargestellt. In der uninduzierten Transfektante konnte das NOV-Protein im Zellkern und im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 32C). Im Gegensatz zu den uninduzierten Transfektanten konnte nach Dox-Induktion eine Kolokalisation von NOV und Cx43 an der Zellmembran beobachtet werden (Abb. 32D; siehe Pfeile). Cx40- und trCx43-Transfektanten zeigten dagegen nach Induktion mit Dox keine Kolokalisation von NOV und Cx40 (Abb. 32E) bzw. trCx43 (Abb. 32F). NOV war hier nicht an der Zellmembran wie die Connexine, sondern im Zellkern bzw. im Zytoplasma lokalisiert. Auffällig war ferner die starke Expression von NOV im Zellkern der trCx43-Transfektanten (siehe Abb. 32F).

In weiteren Untersuchungen wurde der *turnover* des NOV-Proteins nach Dox-Entzug in induzierten Tet/Cx43-Transfektanten untersucht. Die Abbildung 33A zeigt die Ergebnisse der Doppel-Immunfluoreszenz von NOV und Cx43 in einer induzierten Tet/Cx43-Transfektante nach 0, 4, 8, 14, 24 und 48 h Dox-Entzug. Bis 14 h nach Dox-Entzug war noch eine Kolokalisation von NOV und Cx43 an der Zellmembran zu beobachten (siehe Pfeile in Abb. 33A). Deutlich war eine Abnahme der Cx43-Expression zwischen 0 und 14 h zu erkennen, die in einer geringeren Kolokalisationsrate von NOV und Cx43 resultierte. 24 bis 48 h nach Dox-Entzug konnte keine Kolokalisation von NOV und Cx43 mehr an der Zellmembran detektiert werden. Es konnte nur noch eine NOV-Expression im Zellkern bzw. im Zytoplasma beobachtet werden.

Der gleiche zeitliche Rahmen für die Untersuchung nach Dox-Entzug wurde auch gewählt, um die NOV-Expression mittels der semiquantitativen RT-PCR zu analysieren (Abb. 33B). Hier zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der NOV-Expression über den Zeitverlauf von 0 bis 48 h Dox-Entzug in zwei untersuchten induzierten Jeg3-Tet/Cx43-Transfektanten. Die zeitliche Regulation von NOV korrelierte mit der Reduktion der Cx43-Expression nach Dox-Entzug (vgl. Abb. 11).

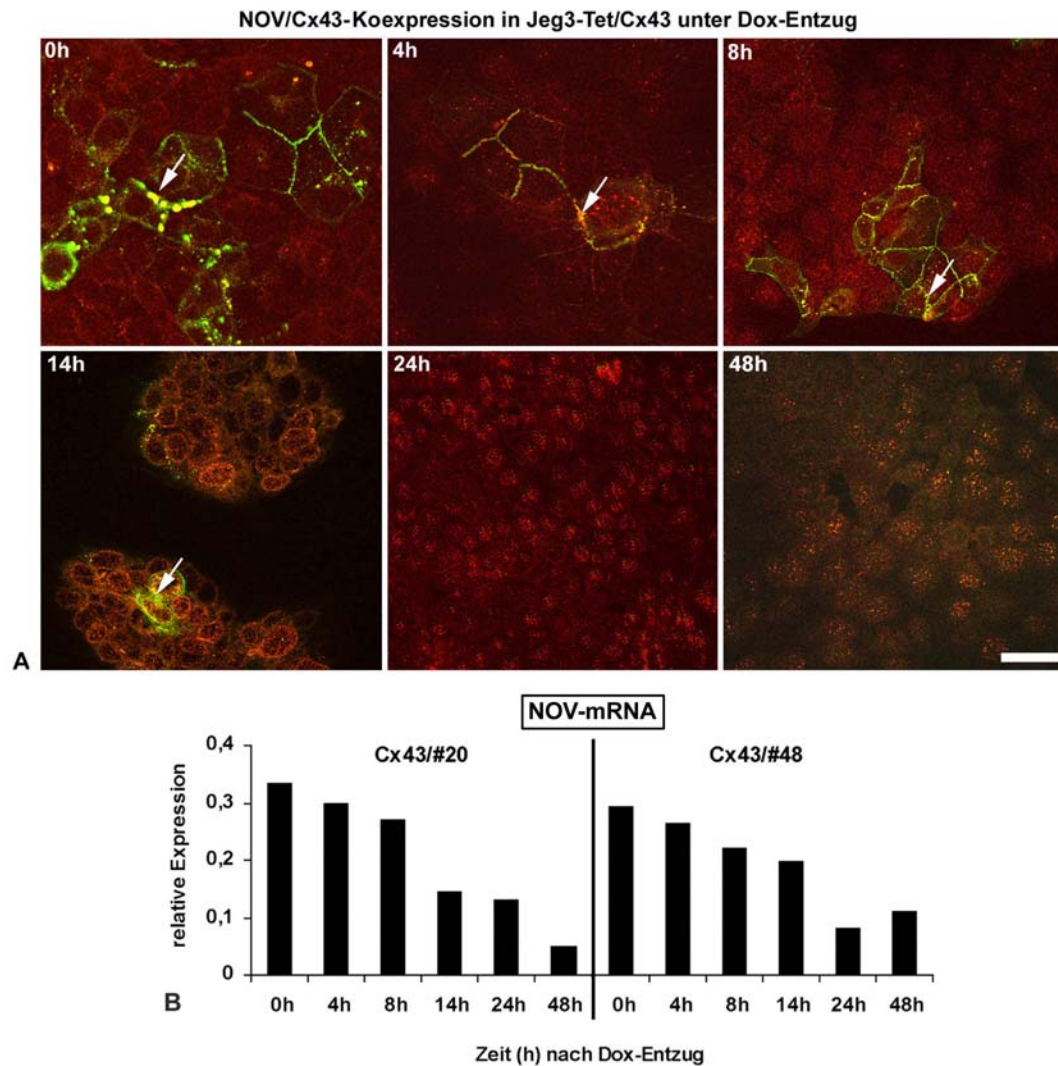


Abb. 33: (A) Immunhistochemischer Nachweis der Kolokalisation von NOV und Cx43 in einer induzierten Tet/Cx43-Transfektante nach Dox-Entzug. NOV/Cx43-Koexpression in Tet/Cx43/#48 nach 0-48 h Dox-Entzug. Noch bis 14 h nach dem Entzug von Dox war eine Kolokalisation der beiden Proteine NOV und Cx43 an der Zellmembran nachzuweisen (siehe Pfeile). 24 h bzw. 48 h nach Dox-Entzug war NOV nur noch im Zellkern und im Zytoplasma exprimiert. Eine Cx43-Expression konnte nicht mehr detektiert werden. Balken: (0, 4 h) 20 μ m, (8, 14, 48 h) 30 μ m und (24 h) 60 μ m.

(B) Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Kinetik der NOV-Expression nach 0-48 h Dox-Entzug in zwei induzierten Tet/Cx43-Transfektanten. Dargestellt ist die relative Expression von NOV nach dem Abgleich gegen β -Aktin. Deutlich ist eine Abnahme der NOV-Expression von 0 bis 48 h nach Dox-Entzug in den beiden Cx43-Zelltransfektanten (Tet/Cx43/#20 und Tet/Cx43/#48) zu erkennen.

4.6.2.4 Analyse der Expression von NOV in der reifen humanen Plazenta

In RT-PCR-Analysen der NOV-Expression in der reifen humanen Plazenta sowie in parentalen Jeg3-Zellen wurde untersucht, ob benigne Trophoblastzellen ebenfalls NOV exprimieren, und, ob es einen Unterschied zum Expressionsmuster im Vergleich zu malignen Jeg3-Zellen gibt (Abb. 34A). In der Plazenta konnte im Mittel eine 2,4fach stärkere Expression von NOV als in den parentalen Jeg3-Zellen nachgewiesen werden. D.h. NOV wird in benignen Zellen der Plazenta stärker exprimiert als in malignen Jeg3-Zellen. Der

Expressionslevel von NOV in den parentalen Jeg3-Zellen lag auf der Höhe der trCx43-Transfektanten (siehe Abb. 30).

Zudem wurde die NOV-Expression in der Plazenta mittels der Immunhistochemie analysiert und mit dem Laserscan-Mikroskop ausgewertet (Abb. 34B, C). Es konnte eine starke Expression von NOV in invadierenden Trophoblastzellen und in Deziduazellen beobachtet werden. NOV wies hier vornehmlich eine intrazelluläre, zytoplasmatische Lokalisation auf. Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen mit NOV und Cytokeratin (Trophoblastzell-Marker) zeigten eine Kolokalisation von NOV und Cytokeratin in Synzytiotrophoblastzellen einer Zotte (Abb. 34C, siehe Pfeilspitzen). Ferner konnte eine starke Expression von NOV im Endothel der embryonalen Gefäße detektiert werden. Endothelzellen konnten von Trophoblastzellen aufgrund der Cytokeratin negativen Expression unterschieden werden (Abb. 34C, Pfeile). Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen von NOV und Cx43 in der reifen humanen Plazenta zeigten keine Kolokalisation von NOV und Cx43 (nicht dargestellt). Cx43 war im Endothel und in Trophoblastzellen an der Zellmembran und teilweise im Zytoplasma exprimiert. NOV konnte sowohl im Endothel als auch in den Trophoblastzellen nachgewiesen werden, war jedoch ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert.

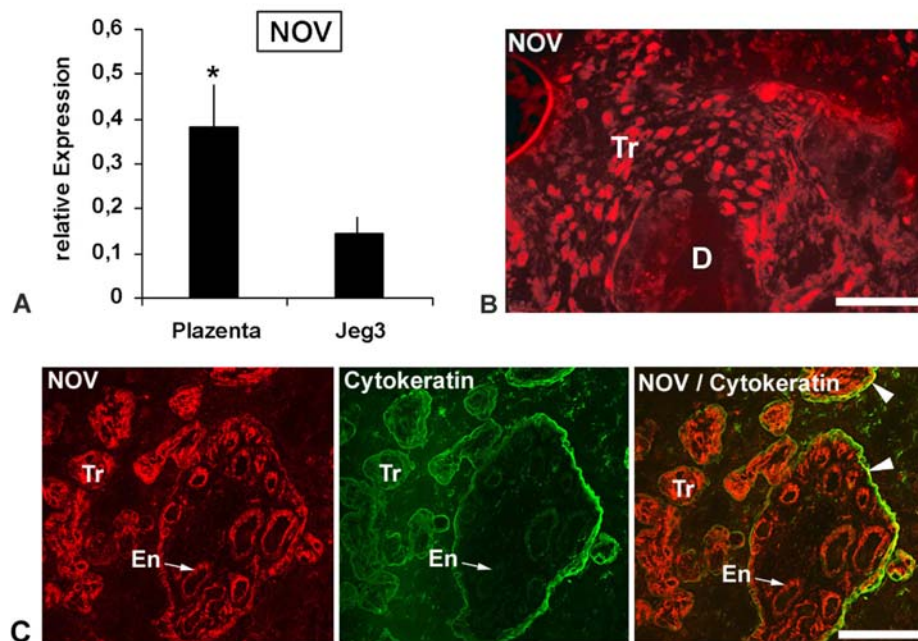


Abb. 34: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der NOV-Expression in der reifen humanen Plazenta und in parentalen Jeg3-Zellen (A). Dargestellt ist die relative Expression von NOV nach dem Abgleich gegen β -Aktin. Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=4$). * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). **(B) Immunhistochemischer Nachweis von NOV in invadierenden Trophoblastzellen in die Dezidua.** NOV zeigte eine starke Expression in invadierenden Trophoblastzellen. Tr: Trophoblast, D: Dezidua. Balken: 150 μ m. **(C) Doppel-Immunfluoreszenz der NOV- und Cytokeratin-Expression im villösen Trophoblasten.** Von links nach rechts: NOV-Fluoreszenz, Cytokeratin-Fluoreszenz und NOV/Cytokeratin Doppel-Immunfluoreszenz. NOV und Cytokeratin zeigten eine Kolokalisation in Synzytiotrophoblastzellen einer Zotte (siehe Pfeilspitzen). Zudem wiesen embryonale Endothelzellen (Cytokeratin negativ) eine starke Expression von NOV auf (siehe Pfeile). Tr: Trophoblast, En: embryonales Endothel. Balken: 60 μ m.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions für die Proliferation, Invasion und Differenzierung des humanen Trophoblasten zu untersuchen. Als Modell für den frühen proliferativen Trophoblasten diente die humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3. Diese Zelllinie zeigt neben den charakteristischen Tumoreigenschaften Merkmale benigner Trophoblastzellen, und bietet sich daher als Modell sowohl für den Trophoblasten als auch für die Tumorgenese an. Postuliert wird, daß Gap Junctions an der Wachstumsregulation beteiligt sind (Yamasaki et al., 1999). In vielen Experimenten konnte eine Transfektion von Connexin-Genen in Tumorzellen das normale Zellwachstum wiederherstellen. Ob diese Eigenschaften der Connexine über den Austausch von Molekülen über den Kanal und / oder über die Beteiligung des C-Terminus des Cx-Proteins an intrazellulären Signalkaskaden vermittelt werden, ist zur Zeit Gegenstand intensiver Studien (Giepmans und Moolenaar, 1998; Ai et al., 2000; Moorby und Patel, 2000; Vine und Bertram, 2002). Die in dieser Arbeit verwendete Jeg3-Zelllinie ist kommunikationsdefizient (Hellmann et al., 1996) und ist daher geeignet, um die Auswirkungen der Expression verschiedener Connexin-Gene zu untersuchen. Im Rahmen dieser Studie wurden zunächst stabile mit verschiedenen Connexin-Genen transfizierte Jeg3-Zelllinien mit Hilfe des induzierbaren Tet-Genexpressionssystems und durch die Verwendung des eukaryontischen zellspezifischen α hCG-Promotors generiert. Nach der Charakterisierung der Transfektanten sowohl auf RNA- und Protein-Ebene als auch hinsichtlich des funktionellen Kopplungsgrades konnte gezeigt werden, daß die Cx43-transfizierten Jeg3-Zellen gegenüber den Cx40- und trCx43-Transfektanten ein reduziertes Proliferationsverhalten *in vitro* sowie ein reduziertes Tumorstadium im Nacktmausmodell aufweisen. Anhand von Befunden aus der Literatur und Hinweisen aus Gene-Array-Analysen wurde NOV, ein Mitglied der CCN-Familie der Wachstumsregulator-Proteine, als hochreguliertes Gen in den Cx43-Transfektanten detektiert und in der semiquantitativen RT-PCR-Analyse verifiziert. Nach Induktion von Cx43 über die Gabe von Dox konnte immunhistochemisch eine Kollokalisierung der beiden Proteine an der Zellmembran beobachtet werden. Welche Rolle die Assoziation von NOV und Cx43 an der Zellmembran für die Veränderung der Zellphysiologie der Cx43-Transfektanten spielen könnte, wird in einem der folgenden Abschnitte diskutiert.

5.1 Genexpressionssysteme: Tet-System und zellspezifischer α hCG-Promotor

Tet-System

Für die Etablierung stabiler Jeg3-Cx-Transfektanten wurde das induzierbare Tet-On-System gewählt (Gossen und Bujard, 1992). Diese gezielte Regulation der Cx-Expression über die

Gabe von Doxyzyklin ermöglichte eine interne Kontrolle der physiologischen Auswirkungen der Cx-Expression. Desweiteren bot dieses System die Möglichkeit, mit Hilfe der gezielten Gabe oder Entzug von Dox die Dynamik des *turnover* eines Proteins zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnten stabile mit Cx43, Cx40, Cx26 und trCx43 transfizierte Jeg3-Zellen mit Hilfe des Tet-On-Systems hergestellt werden. Der Einsatz von C-terminal trunkiertem Cx43 (trCx43) sollte den Einfluß des C-Terminus auf die Zellphysiologie der Transfektanten ermitteln. Es ist bekannt, daß der C-Terminus an Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist (Willecke et al., 2002). Die etablierten Transfektanten wiesen eine stabile und regelbare Expression der Cx-Transkripte und -Proteine auf. Zudem konnte eine verlässliche Korrelation zwischen der Stärke der mRNA- und Protein-Expression festgestellt werden. Eine Analyse der Kinetik der Dox-Induktion und des -Entzuges in Jeg3-Tet/Cx43-Transfektanten auf der RNA-Ebene mittels RT-PCR bestätigte die schnelle Regulierbarkeit der Cx-Expression über Dox. Cx43 wies ungefähr eine Halbwertszeit von 5 Stunden auf. Fishman et al. (1995) konnten mit Hilfe des Tet-Off-Systems in Cx32-transfizierten SKHep1-Hepatomazellen ähnliche Ergebnisse in der Kinetik und in der Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Menge und dem Kopplungsgrad der Zellen erzielen.

Der eukaryontische Tet-Promotor, ein humaner *minimal cytomegalovirus* Promotor, sorgt in diesem System für eine starke stabile Expression der exogenen Cx-Gene. Dagegen konnte mit dem Einsatz von viralen Promotoren wie dem SV40-Promotor keine stabile Expression der Connexine erzielt werden (Hellmann et al., 1999). Eine Gen-Inaktivierung durch Abstellen von herkömmlichen viralen Promotoren (SV40-Promotor u.a.), durch z.B. Methylierung der Promotorsequenzen, ist in der Literatur dokumentiert (Razin und Cedar, 1991; Byrans et al., 1992; Qu und Ehrlich, 1999).

Ein bekannter Fehler im Tet-On-System ist eine geringe (*leaky*) Expression in der Abwesenheit von Dox (Fussenegger, 2001). Besonders die generierten HeLa-Tet/Cx43-Transfektanten wiesen eine exogene Cx43-Expression auch im uninduzierten Zustand auf. Dieses Leck im Tet-Promotor beruht auf der intrinsischen Aktivität der Tet-Promotorsequenz (Bujard-Homepage: www.zmbh.uni-heidelberg.de/bujard). Diese Aktivität kann von der Integrationsstelle im Genom, von in der Nähe liegenden endogenen transkriptionalen Enhancer-Elementen oder von der Kopienzahl in den Zellen abhängen. Auch andere Arbeiten konnten mit dem Tet-Off-System eine Expression des transfizierten Gens im uninduzierten Zustand beobachten (Fishman et al., 1995; Link et al., 2001). In jüngster Zeit wurden aus diesem Grund Tetrazyklin kontrollierte transkriptionale *Silencer* (tTs) entwickelt, die in Kombination mit dem reversen Transaktivator rtTA die *leaky* Expression unterdrücken ohne die Induzierbarkeit des Zielgens einzuschränken (Zhu et al., 2002). Ferner wurden neue Varianten der Tet-basierten Regulatoren untersucht, um die *leakiness* der Genexpression zu minimieren (Kamper et al., 2002; Lamartina et al., 2002). Daher war es für

diese Studie wichtig, Klone, die keine Expression im uninduzierten Zustand und eine hohe Expression nach Induktion über Dox aufweisen, gezielt auszusuchen. So wurden in dieser Arbeit aufgrund der Ergebnisse der Untersuchung der Cx-mRNA- und Protein-Expression zwei bis drei Zellklone je Cx-Konstrukt für die weiteren Experimente ausgewählt. Diese Cx-Transfektanten wiesen unterschiedliche Mengen an transfizierter Cx-mRNA in der Northern-Blot-Analyse auf. Die Varianz im Cx-Expressionsmuster nach Transfektion konnte durch andere Arbeiten bestätigt werden. Diese kann auf unterschiedliche Stellen der chromosomalen Insertion, der Anzahl an Kopien der eingebrachten Plasmide im Genom der Zellen oder der Anzahl an transfizierten Zellen beruhen (Zhu et al., 1991a; Hellmann et al., 1999).

Im Hinblick auf die Charakterisierung des Cx-Expressionsmusters der Transfektanten ist noch ein weiteres Ergebnis interessant. Die Untersuchung der Cx43-Expression in den als Kontrollzelllinie anfänglich eingesetzten Cx43-transfizierten HeLa-Tet-On-Zellen zeigte nach Dox-Gabe eine Hochregulation der endogenen Cx43-Expression. Diese Zellen wurden aus diesem Grunde für weitere Experimente ausgeschlossen. Auch die uninduzierten HeLa-Cx43-Transfektanten und die parentalen HeLa-Zellen, die in der Literatur als Cx43-negativ beschrieben werden (Elfgang et al., 1995; Mesnil et al., 1995), wiesen eine schwache endogene Cx43-Expression auf. Diese Hochregulation von endogenem Cx43 wurde auch in anderen Tet-induzierbaren HeLa-Cx43-Transfektanten beobachtet (King et al., 2000a, b). Diese beruht auf einer klonalen Heterogenität der HeLa-Zelllinie, die durch eine variable Expression von endogenem Cx43 gekennzeichnet ist (King et al., 2000a, b). Auch Cx43-transfizierte C6-Gliomazellen zeigten eine Hochregulation des endogenen Cx43 (Zhu et al., 1991a). Die dabei ablaufenden Mechanismen sind noch unbekannt. Vermutlich werden nur Transkripte bereits endogen exprimierter Cx-Gene zelltypspezifisch hochreguliert. In dieser Arbeit konnte in keiner der Jeg3-Cx-Transfektanten eine derartige Regulation von endogenen Connexinen nachgewiesen werden.

Zellspezifischer α hCG-Promotor

Als zweites System wurden Cx-Transfektanten mit dem eukaryontischen gewebe-spezifischen α hCG-Promotor (Pestell et al., 1994) generiert. Dieser sollte für eine stabile konstitutive Expression der Connexine sorgen, da Jeg3-Zellen, wie Trophoblastzellen, hCG, humanes Choriongonadotropin, produzieren (Kohler et al., 1971; Kliman et al., 1986). Jedoch führte eine Analyse von ca. 80 Klonen pro Cx-Konstrukt nur bei den α hCG/Cx43-transfizierten Jeg3-Zellen zu zwei Klonen mit einer schwachen, inhomogenen aber stabilen Cx43-Expression. Diese schwache Expression der exogenen Connexin-Gene war vermutlich auf den zellspezifischen α hCG-Promotor zurückzuführen, der im Gegensatz zu den starken viralen Promotoren nur eine schwache Aktivität aufweist (Qiao et al., 2002). Interessant war hingegen, daß die α hCG/Cx43-Transfektanten sowohl in den Proliferationsstudien *in vitro* als

auch in den Analysen des Tumorwachstums in der Nacktmaus die stärksten reduzierenden Eigenschaften aufwiesen. Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten könnte die Gewebespezifität des Promotors sein, der im Gegensatz zu viralen Promotoren für zellphysiologische Bedingungen sorgt.

Zusammenfassend erwies sich das Tet-System als die geeignetere Methode, um stabile, stark exprimierende Jeg3-Cx-Transfektanten für verschiedene Connexin-Gene herzustellen. Ferner bot es den Vorteil der gezielten Regulation der Cx-Expression.

5.2 Quantifizierung des Kopplungsgrades mit Hilfe der FACS-Analyse des Calcein-Transfers

Im Rahmen der Charakterisierung der Cx-Transfektanten wurde die Funktionalität der Gap Junction-Kanäle überprüft und der Kopplungsgrad der Zellklone bestimmt. Dafür wurde der Farbstoff-Transfer-Assay mit dem kanalgängigen Calcein in Kombination mit der fluoreszenzaktivierten Durchflußzytometrie in modifizierter Form eingesetzt (Tomasetto et al., 1993; Czyz et al., 2000). Nach einer vierstündigen Kokultur von Dil gefärbten Akzeptorzellen und Calcein gefärbten Donorzellen konnte die Anzahl an Calcein positiven, gekoppelten Akzeptorzellen ermittelt und der Grad der Kopplung berechnet werden. Dieses Verfahren konnte im Rahmen dieser Arbeit als eine effiziente und verlässliche Technik etabliert werden. Zudem konnte erstmalig die regelbare Kopplung über Gap Junctions mit dem induzierbaren Tet-System mittels der FACS-Analyse quantifiziert werden. Die bisher angewendete und weit verbreitete Methode der Mikroinjektion von Gap Junction permeablen Farbstoffen wie Lucifer Yellow in eine Zelle zur Ermittlung des Kopplungsgrades weist dagegen viele Nachteile auf (Elfgang et al., 1995). Die Zelle wird durch die Injektion des Farbstoffes verletzt und das Auszählen der gekoppelten Zellen ist subjektiv (-Unterscheidung zwischen gekoppelten und nicht gekoppelten Zellen-) und zeitaufwendig. Zudem kann nur eine geringe Anzahl an Zellen pro Experiment ausgewertet werden. Desweiteren weisen verschiedene Connexine unterschiedliche Permeabilitäten je nach verwendetem Farbstoff auf (Steinberg et al., 1994; Elfgang et al., 1995; Cao et al., 1998). Cao et al. (1998) konnten z.B. im *Xenopus*-Oozyten-System nachweisen, daß Cx32-gekoppelte Oozyten eine 6fach größere Permeabilität für Lucifer Yellow aufweisen als solche, die über Cx26 gekoppelt sind. Heterotypische Gap Junction-Kanäle aus Cx32/Cx26 zeigten dagegen wieder andere Permeabilitäts-Charakteristika (Cao et al., 1998). Ein großer Vorteil der hier angewendeten FACS-Analyse des Calcein-Transfers ist neben der Zuverlässigkeit der Ergebnisse die Erfassung des Kommunikationsgrades eines gesamten Zellklons und nicht nur einzelner gekoppelter Zellpaare wie über die Mikroinjektion von Farbstoffen.

5.2.1 Homologe Kopplungsanalysen der Jeg3-Cx-Transfektanten

In homologen Kopplungsuntersuchungen der Jeg3-Tet/Cx-Transfektanten konnte nach Induktion der jeweiligen Connexine über die Gabe von Dox eine in den einzelnen Zellklonen unterschiedliche Erhöhung der Kopplung über Gap Junctions im Vergleich zum uninduzierten Zustand nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Cx43-Transfektanten eine im Mittel bis zu 4fache Erhöhung der Zellkopplung nach Induktion mit Dox. Es konnte in den meisten Fällen eine starke Korrelation zwischen der Menge an exprimierter Cx-mRNA und -Protein und dem Grad der Kommunikation in den Transfektanten beobachtet werden. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten diese Korrelation ebenfalls zeigen (Zhu et al., 1991a; Hellmann et al., 1999). Durch die FACS-Analyse des Calcein-Transfers konnte zudem die Funktionalität des trunkierten Cx43-Kanals verifiziert werden. Bei diesem Konstrukt fehlt der größte Teil des C-Terminus. Dabei ist der Kanal aber funktionell intakt, jedoch ist die Regulation des Öffnens und Schließens des Kanals beeinträchtigt (Maass, persönliche Mitteilung). Weiterhin zeigten die Befunde der FACS-Analysen, daß die induzierten Cx43- und Cx26-Transfektanten eine höhere Kopplungsfähigkeit (61,1-86%) als die induzierten Cx40-transfizierten Zellklone (23,7-63,2%) aufwiesen. Eine mögliche Ursache könnte in der unterschiedlichen Permeabilität der Cx-Kanäle für Calcein liegen. Auch Czyz et al. (2000) konnten für Cx40 eine geringere Permeabilität für Calcein im Vergleich zu Cx43 nachweisen. Darüber hinaus wurde in Cx40-transfizierten HeLa-Zellen eine höhere Gesamtleitfähigkeit und eine geringere Permeabilität für Lucifer Yellow als in Cx43-transfizierten HeLa-Zellen detektiert (Traub et al., 1994; Valiunas et al., 2002).

Die Kopplungsergebnisse der Vektorkontroll-Zellen zeigten im Durchschnitt ca. 10% unspezifische Kopplung. Da die Vektorkontroll-Zellen keine Cx-Expression im Northern-Blot und in der Immunhistochemie aufwiesen, kann dies nur mit der Kompensationseinstellung des FACS-Gerätes bei der Auswertung der beiden Fluoreszenzen im Calcein- und Dil-Kanal erklärt werden. Da das Calcein-Emissionsspektrum mit dem des Dil-Spektrums überlappt, wird auch Calcein-Fluoreszenz im Dil-Kanal detektiert. Dies erfordert eine Kompensation.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Analyse der *leakiness* der Cx-Expression in der Abwesenheit von Dox. Diese konnte mit Hilfe des Assays für jeden Zellklon ermittelt werden. Eine schwache Zellkopplung im uninduzierten Zustand war in den verschiedenen Zellklonen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Cx-Expressionsanalysen zeigten jedoch kaum eine Expression im uninduzierten Zustand. Scheinbar konnten in der sensitiveren physiologischen Analyse der Zellkopplung mit Hilfe der FACS-Analyse diese geringen Cx-Mengen eher detektiert werden als im Northern-Blot und in der Immunhistochemie.

Eine wichtige Fragestellung bezüglich dieser Untersuchungen war, ob eine unterschiedliche Menge an interzellulärer Kommunikation auch zu einem unterschiedlichen physiologischen Verhalten führt. Durch die Befunde dieser Arbeit konnte in Bezug auf die Proliferations-

studien *in vitro* und Tumorwachstumsanalysen keine eindeutige Aussage getroffen werden. Die Cx43-Transfektanten wiesen zwar ein reduziertes Verhalten in der *in vitro*-Proliferation und im Tumorwachstum auf, jedoch konnte keine direkte Korrelation zwischen der Cx-Expressionsmenge, Kopplungsgrad und der Stärke der Reduktion des Zellwachstums detektiert werden. Z.B. wies die Jeg3- α hCG/Cx43/#2-Transfektante neben einer schwachen Cx43-Expression auf der Transkript- und Protein-Ebene und einem schwachen homologen Kopplungsgrad eine starke Reduktion des *in vitro*-Zellwachstums und des Tumorwachstums in der Nacktmaus auf. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen daher die Vermutung, daß die Funktion der Connexine als Proteine mit Signaltransduktionsfähigkeiten neben der Bedeutung als Zell-Zell-Kanal eine zunehmende Rolle spielt. Auf diese Aspekte wird später im Zusammenhang mit den zellphysiologischen Veränderungen der Jeg3-Transfektanten intensiver eingegangen.

5.3 Gap Junctions und Invasion

5.3.1 Charakterisierung der heterologen Kopplungsfähigkeit von Jeg3-Cx-Transfektanten mit Endothelzellen *in vitro*

Zahlreiche Untersuchungen konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer heterologen Kommunikation zwischen Tumorzellen und Zellen des Wirtsgewebes, z.B. Endothelzellen, und der Möglichkeit zur Invasion nachweisen (Bräuner und Hülser, 1990; El-Sabban und Pauli, 1991; Ito et al., 2000; Lin et al., 2002). *In vitro*-Invasionsassays zeigten, daß verschiedene Tumorzellen schnell in das Wirtsgewebe invadieren, wenn diese miteinander heterolog kommunizieren können (Bräuner und Hülser, 1990). Wie die humanen Trophoblastzellen sind auch Chorionkarzinomzellen in der Lage, in Gefäße zu invadieren und Endothelzellen zu ersetzen (Zhou et al., 1997; Grümmer et al., 1999). Die Chorionkarzinomzelllinien (Jeg3, BeWo und JAr) weisen wie die proliferativen extravillösen Trophoblastzellen und das männliche Chorionkarzinom unterschiedliche Mengen von Cx40 auf (Hellmann et al., 1996; Winterhager et al., 1999; von Ostau, 1997). Die Gründe für die starke hämatogene Metastasierung liegen möglicherweise darin, daß die Chorionkarzinomzellen über Cx40 sowohl mit Cx40- als auch mit Cx37-Kanälen der Endothelzellen eine heterologe Kopplung herstellen und sich daher besser zwischen den Endothelzellen integrieren können. Endothelzellen exprimieren Cx43, Cx40 und Cx37 (Van Rijen et al., 1997). Ebenso scheint neuerdings auch eine heterotypische Kopplung zwischen Cx40 und Cx43 möglich zu sein. Cottrell und Burt (2001) konnten dies, entgegen den Befunden von Bruzzone et al. (1993), an Zelltransfektanten mit elektrophysiologischen Methoden nachweisen. Auch führten Kopplungsversuche zwischen Jeg3-Tet/Cx43- und Tet/Cx40-Transfektanten im Rahmen dieser Arbeit zu funktionellen heterotypischen Cx43/Cx40-Kanälen (Daten nicht gezeigt). Viele Studien bestätigten die Existenz von

Mosaikendothelien mit Tumorzellen (vaskuläres Mimikry) (Maniotis et al., 1999; McDonald et al., 2000). Mosaik-Blutgefäße sind auch in Uvealmelanomen *in vivo* und *in vitro* (Maniotis et al., 1999) und in Kolonkarzinomen *in vivo* (Chang et al., 2000) beschrieben worden.

In dieser Arbeit wurde die heterologe Kommunikationsfähigkeit der Jeg3-Cx-Transfektanten mit der Maus-Endothelzelllinie bEnd3 mit Hilfe des Calcein-Transfer-Assays untersucht. bEnd3-Zellen exprimieren die endothelzellspezifischen Connexine Cx43, Cx40 und Cx37 (Kwak et al., 2001) und repräsentieren somit die *in vivo*-Situation (Van Rijen et al., 1997). In diesen Untersuchungen wiesen die Tet/Cx43-Transfektanten nach Induktion mit Dox eine heterologe Kopplung mit den Endothelzellen auf. Diese war in den meisten Fällen schwächer im Vergleich zur homologen Kopplung. Ein geringerer Grad der Farbstoffkopplung zwischen heterologen gegenüber homologen Zellpopulationen ist in der Literatur bereits beschrieben worden (Kiang et al., 1994). Cx26-transfizierte Jeg3-Zellen konnten dagegen nicht mit den bEnd3-Zellen heterolog koppeln. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit Cx43- und Cx26-transfizierten HeLa-Tet-Transfektanten erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Cx43-Transfektanten waren dabei entweder über eine homotypische Kopplung mit Cx43 oder über eine mögliche heterotypische Kopplung mit Cx40 in der Lage, funktionelle Kanäle mit den bEnd3-Zellen aufzubauen (Elfgang et al., 1995; Czyz et al., 2000; Cottrell und Burt, 2001). Die Ergebnisse dieser Kopplungsexperimente werden durch Befunde anderer Arbeitsgruppen gestützt. Graeber und Hülser (1998) konnten in einem *in vitro*-Invasionsassay mit kultivierten Hühnerherzfragmenten nachweisen, daß Cx43-transfizierte HeLa-Zellen invasiver als Cx40-Transfektanten waren. In Gliomazellen führte eine Cx43-Transfektion zu einer erhöhten Invasivität der Tumorzellen durch die Bildung von heterologen Cx43-Kanälen mit Astrozyten (Lin et al., 2002). Dagegen reduzierte Cx43 in Plattenepithelkarzinomen das Invasionspotential durch das Endothel (Shibata et al., 2000). Cx26-transfizierte Jeg3- und HeLa-Zellen konnten nicht mit den Endothelzellen koppeln, da bEnd3 kein Cx26 exprimiert und Cx26-Connexone anscheinend weder mit Cx43- noch mit Cx40- und Cx37-Halbkanälen funktionelle Kanäle ausbilden können. Diese Befunde decken sich mit denen von Elfgang et al. (1995), die auch keine heterologe Kopplung zwischen Cx26 und Cx43, Cx40 sowie Cx37 mittels Lucifer Yellow-Injektion in HeLa-Cx-Transfektanten beobachten konnten. Dagegen wiesen Ito et al. (2000) eine Kopplung zwischen Cx26-exprimierenden Melanomzellen und Endothelzellen von geöffneten Venensegmenten nach. Wie es hier trotz der oben genannten Ergebnisse zu einer Ausbildung einer heterologen Kopplung zwischen Endothel- und Melanomzellen kommen konnte, bleibt ungeklärt. Ferner wurde ein verstärktes Metastasierungspotential der Melanomzellen mit erhöhter Expression von Cx26 beobachtet (Ito et al., 2000). Weitere Befunde konnten aber auch eine Reduktion der Invasivität von HepG2-Zellen mit einer verstärkten Cx26-Expression der Zellen in Verbindung bringen (Yano und Yamasaki, 2001). Diese widersprüchlichen Ergebnisse

zeigen, daß die Invasion vermutlich connexin- und zelltypspezifisch und vom Untersuchungssystem abhängig ist.

Derzeit werden *in vitro*-Invasionsassays von den generierten Jeg3-Cx-Transfektanten in Kokultur mit bEnd3-Endothelzellen im Monolayer durchgeführt. Die ersten Ergebnisse zeigen, daß sowohl Cx43- als auch Cx26-transfizierte Jeg3-Zellen gleichermaßen nach Induktion der Cx-Expression über die Gabe von Dox ein reduziertes Invasionsverhalten durch die Filtermembran gegenüber den uninduzierten Zellen aufweisen. Ebenso konnte in der Monolayer-Kokultur eine deutliche Trennung der Endothelzellen und der jeweiligen Cx-Transfektanten in Form von isolierten Zellkolonien beobachtet werden. In diesem System hängt anscheinend die Invasion nur von den etablierten Zell-Zell-Kontakten ab und nicht von der Art des Connexins bzw. von der Art der heterologen Kopplungsmöglichkeit. Die Ausbildung von Gap Junctions führt zu einem erhöhten Adhäsionsvermögen der Jeg3-Transfektanten und deshalb zu einer reduzierten Invasion. Ob es auch in diesem System zu einer heterologen Kopplung zwischen Jeg3-Transfektanten und Endothelzellen kommt, konnte nicht gezeigt werden. Durch *in vitro*-Invasionsexperimente der etablierten Jeg3-Cx-Transfektanten mit einem Monolayer aus Deziduazellen konnten die Befunde gestützt werden (Kooperation mit S.J. Lye, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto). Die Expression von Cx43 und Cx40 inhibierte die Invasion in den Dezidua-Monolayer im Vergleich zu den parentalen Jeg3-Zellen. Auch *in vitro*-Invasionsassays von Hellmann (1995) mit anderen Cx-transfizierten Jeg3-Zellen ohne Kokultur mit Endothelzellen zeigten ähnliche Ergebnisse. Hier wiesen die Cx43-transfizierten Jeg3-Zellen die stärkste Abnahme der Invasion auf. Für weitere Invasionsexperimente wären dreidimensionale Assays mit Multizellsphäroiden unter der Verwendung von Hühnerherzfragmenten als Wirtsgewebe einzusetzen (Bräuner und Hülser, 1990; Graeber und Hülser, 1998). In diesem der Situation *in vivo* sehr nahekommenden räumlichen System ist möglicherweise eher eine heterologe Kommunikation und somit eine erleichterte Invasion möglich.

5.3.2 Charakterisierung des Invasionsverhaltens der Jeg3-Cx-Transfektanten *in vivo*

Die Chorionkarzinomzellen Jeg3 bilden in Nacktmäusen schnell wachsende hämorrhagische Tumore (Grümmer et al., 1999). Diese entstehen durch eine Arrosion der Wirtsgefäße und daraus resultierender Bildung von blutgefüllten Lakunen, ähnlich wie bei der Etablierung der Plazenta durch benigne Trophoblastzellen. Die Lakunen werden überwiegend von Trophoblastzellen, z.T. aber auch von Wirtsendothelien, ausgekleidet. Tumore aus nicht trophoblastischen Zellen wie z.B. HeLa-Zellen wachsen dagegen langsamer und weisen Neoangiogenese auf (Grümmer et al., 1999). Die Bewertung des Invasionsverhaltens der verschiedenen Jeg3-Cx-Transfektanten nach subkutanem Wachstum in der Nacktmaus

erwies sich wegen des heterogenen Tumorwachstums und der teilweise stark nekrotischen Tumore als äußerst schwierig. Morphologisch zeigte sich tendenziell eine größere Menge an Trophoblast-Riesenzellen in den Cx43-Tumoren im Vergleich zu den Cx40- und trCx43-Tumoren. Diese waren im Tumorgewebe und in den Lakunen zu finden. Die mit Cx40 transfizierten Jeg3-Zellen wiesen eine Tendenz zu einer verstärkten Invasion in das umliegende Mausgewebe auf. Ferner konnte kein Unterschied in der Integrin-Expression in den einzelnen Cx-Tumoren beobachtet werden. Alle untersuchten Jeg3-Cx-Tumore wiesen eine starke Expression der Integrine β_4 , α_1 und α_6 unabhängig vom transfizierten Connexin auf. Es ist bekannt, daß ein Wechsel des Integrin-Expressionsmusters die Invasion des benignen Trophoblasten in das endometriale Gewebe reguliert (Damsky et al., 1992, 1994; Fisher und Damsky, 1993). Dabei exprimieren die Zytotrophoblaststammzellen $\alpha_6\beta_4$ -Integrin. Differenzierende Zytotrophoblastzellen der Zellsäulen zeigen dagegen eine Expression von $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, während invasive Trophoblastzellen durch eine $\alpha_1\beta_1$ -Integrin-Expression gekennzeichnet sind. Auch Unterschiede in der Angiogenese, d.h. in der Ausbildung / Einsprossung von Gefäßen, konnten nicht beobachtet werden. Unterschiede zeigten sich jedoch in der Expression des EGF-Rezeptors. Dabei wiesen die Cx43-Tumore sowohl auf der RNA- als auch auf der Protein-Ebene in den analysierten Tumoren eine stärkere EGF-R-Expression gegenüber den entsprechenden Vektorkontrollen und den Cx40-Tumoren auf. Der EGF-Rezeptor, ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, wird vom proliferativen villösen Trophoblasten, nicht dagegen vom invasiven extravillösen Trophoblasten, exprimiert (Mühlhauser et al., 1993; Jokhi et al., 1994). Zudem wurde eine Expression in den terminal differenzierten Riesenzellen und in dem villösen Synzytiotrophoblasten beschrieben. Auch in Jeg3-Zellen konnte der EGF-Rezeptor nachgewiesen werden (Cao et al., 1995). Da tendenziell mehr Trophoblast-Riesenzellen in den Cx43-Tumoren vorhanden waren, würde dies mit deren verstärkter EGF-R-Expression korrelieren. Widersprüchlich dagegen war, daß die Cx40-Tumore, die durch stark proliferative Eigenschaften gekennzeichnet waren, eine schwächere Expression des EGF-Rezeptors zeigten. Dies könnte damit erklärt werden, daß diese vielleicht das Protoonkogen c-erbB2 exprimieren, einen mit dem EGF-Rezeptor eng verwandten Tyrosin-Kinase-Rezeptor. c-erbB2 wird hauptsächlich von extravillösen Trophoblastzellen exprimiert (Jokhi et al., 1994). Eine Analyse der c-erbB2-Expression in den Cx-Tumoren wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Zusammenfassend führten die Untersuchungen des Invasionsverhaltens der Cx-Transfektanten *in vivo* zu keinen deutlichen Ergebnissen hinsichtlich eines Cx-spezifischen Verhaltens.

5.4 Die Transfektion von Cx43 verändert das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der malignen Trophoblastzelllinie Jeg3 *in vitro* und *in vivo*

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung des Cx43- und Cx40-Kanals, da die Expression dieser beiden Gap Junction-Proteine für die Differenzierung des humanen Trophoblasten in verschiedene Subpopulationen eine wichtige Rolle spielt. In der humanen Plazenta existieren zwei distinkte Differenzierungswege der Zytotrophoblastzellen, die zu einem Fusions-Phänotyp (villöser Trophoblast) und einem proliferativen / invasiven Phänotyp (extravillöser Trophoblast) führen (Cronier et al., 2001). Cx40 wird von den proliferativen / invasiven Trophoblastzellen der Zellsäulen und -inseln exprimiert (Winterhager et al., 1999). Die Cx40-Expression wird unterdrückt, wenn die Zellen in das endometriale Gewebe invadieren (Winterhager et al., 1999). Eine Expression von Cx43 und eine funktionelle Kopplung konnten dagegen zwischen Zytotrophoblastzellen sowie zwischen Zyto- und Synzytiotrophoblast und im Zytoplasma vom Synzytiotrophoblasten gezeigt werden (Cronier et al., 1994a, 1997, 2001, 2002). Auch in Trophoblast-Riesenzellen, die als terminale Differenzierung entlang des invasiven Differenzierungsweges gebildet werden, konnte Cx43 nachgewiesen werden (Al-Lamki et al., 1999). Diese Befunde zeigen, daß den beiden Connexinen Cx43 und Cx40 zwei unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Trophoblast-Differenzierung zukommen. Cx43 scheint im Differenzierungsprozeß zum Synzytiotrophoblasten involviert zu sein, während Cx40 die Proliferation des extravillösen Trophoblasten aufrecht erhält.

Ob sich Unterschiede im Proliferationsverhalten in den mit verschiedenen Connexinen transfizierten Jeg3-Zellen ergeben, wurde in *in vitro*-Proliferationsstudien untersucht. Dabei zeigten die analysierten Tet/Cx43-Transfektanten nach Dox-Induktion eine signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zum uninduzierten Zustand und zur Vektorkontrolle. Ebenso wiesen auch die α hCG/Cx43-Zellklone eine starke Proliferationsreduktion nach Gabe von cAMP gegenüber den unbehandelten Zellklonen und der cAMP-behandelten Vektorkontrolle auf. Dagegen konnte in den untersuchten mit Cx40, Cx26 und trCx43 transfizierten Jeg3-Tet-Transfektanten kein Unterschied im Zellwachstumsverhalten zwischen induzierten und uninduzierten Zellen beobachtet werden. Dabei wiesen die Cx40-Transfektanten die stärkste Proliferation auf. Diese war gegenüber den Tet/Cx43-Zellklonen am Tag 10 nach der Ausplattierung der Zellen signifikant erhöht.

Die *in vitro*-Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Tumorstudien der Jeg3-Cx-Transfektanten nach subkutaner Injektion in die Nacktmaus. Auch *in vivo* führte die Cx43-Expression in den Jeg3-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Tumore im Vergleich zu den Vektorkontroll-Tumoren in derselben Maus. Dagegen wiesen die Cx40- und trCx43-Tumore kein eindeutig reduziertes Wachstum, sondern eher ein tendenziell stärkeres Tumorstudium gegenüber der Vektorkontrolle auf. Die große Variabilität im

Tumorstadium in Cx-Tumoren und Vektorkontroll-Tumoren zwischen den Tieren könnte durch den unterschiedlichen Immunstatus der immundefizienten Nacktmäuse bedingt sein. Die Nacktmäuse weisen durch ihre angeborene Aplasie des Thymus ein defizientes T-Lymphozyten-System auf (Wortis, 1971). Da die Ausbildung der B-Lymphozyten jedoch noch vorhanden ist, besitzen die Nacktmäuse noch eine Restimmunität, die je nach Versuchstier unterschiedlich ausgeprägt sein kann.

Eine Veränderung der Expressionsmuster der Zellzyklusgene in den Jeg3-Cx-Transfektanten, die zu einem veränderten Proliferationsverhalten führen könnten, wurde im Gene-Array nicht gefunden. Eine Untersuchung der Dauer der Zellzyklusphasen wurde nicht durchgeführt. Auch Hellmann et al. (1999) konnten in Cx-transfizierten Jeg3-Zellen mit einem reduzierten Proliferationsverhalten keine Veränderungen im Zellzyklus detektieren. Gleiche Ergebnisse wurden zudem mit transfizierten Gliomazellen erzielt (Gupta et al., 2001).

Befunde anderer Arbeitsgruppen stützen die oben genannten Ergebnisse der Proliferations- und Tumorstadiumsanalysen. Nach Transfektion von Cx43 konnte ebenfalls eine Reduktion des *in vitro*-Zellwachstums in transformierten Maus-10T1/2-Zellen (Metha et al., 1991), in Ratten-C6-Gliomazellen (Zhu et al., 1991a, 1992), in humanen Ovarialkarzinomzellen SKOV-3 (Fernstrom et al., 2002), in Brustdrüsenkarzinomzellen (Hirschi et al., 1996) und in der humanen Lungenkarzinomzelllinie PG (Zhang et al., 1998) nachgewiesen werden. Eine Reduktion des Wachstumsverhaltens von Cx43-transfizierten Tumorzellen konnte auch nach subkutaner Injektion in Nacktmäusen z.T. verifiziert werden (Zhang et al., 1998; Fernstrom et al., 2002). Dagegen zeigten Versuche mit Tet-induzierbaren HeLa-Cx43-Transfektanten keine Reduktion des Zellwachstums *in vitro*, jedoch eine Reduktion des Tumorstadiums *in vivo* (King et al., 2000a). Untersuchungen mit Cx-transfizierten Jeg3-Zellen unter der Kontrolle des SV40-Promotors zeigten widersprüchliche Ergebnisse (Hellmann et al., 1999). Während Cx26-Transfektanten die stärksten proliferationshemmenden Eigenschaften aufwiesen, zeigte der Cx43-Kanal nur eine leichte Reduktion des Zellwachstums. In früheren Proliferationsstudien jedoch konnte Hellmann (1995) in Jeg3-Cx43-Transfektanten die stärkste Reduktion der Proliferation beobachten, während Cx26- und Cx40-Zellklone keine Unterschiede im Zellwachstum zu den parental Zellen aufwiesen. Auch in Cx-transfizierten BeWo-Chorionkarzinomzellen zeigten die mit Cx43 transfizierten Zellklone ein reduziertes Wachstumsverhalten im Vergleich zu den Cx40-Transfektanten (Gerke, 2001). Mesnil et al. (1995) dagegen konnten an HeLa-Zellen zeigen, daß eine Transfektion von Cx26 jedoch nicht von Cx43 und Cx40 zu einer Suppression der Proliferation *in vitro* und *in vivo* führt. Da Cx26 das zervixspezifische Connexin darstellt, weisen diese Ergebnisse auf den zelltyp- bzw. gewebespezifischen Einfluß der Connexine hin.

Die Ergebnisse der Wachstumsanalysen der in dieser Arbeit generierten Jeg3-Tet/Cx40-Transfektanten bestätigen, daß Cx40 mit der Aufrechterhaltung der Proliferation bzw. mit einer starken Zellteilung assoziiert zu sein scheint. Dies korreliert auch mit der Cx40-Expression in den extravillösen proliferativen Trophoblastzellen der humanen Plazenta sowie in Chorionkarzinomzelllinien und in dem männlichen Chorionkarzinom. Befunde, die eine Beteiligung des Cx40-Kanals an der Aufrechterhaltung der Proliferation unterstützen, beruhen auf Experimenten mit frühen villösen Plazenta-Gewebekulturen (Nishimura et al., 2003; zur Veröffentlichung eingereicht). Die Inhibition der Gap Junction-Kopplung mit Heptanol oder die Behandlung mit Cx40-Antisense-Oligonukleotiden führte in diesen Kulturen zu einem Verlust des proliferativen Phänotyps. Eine Herunterregulation von Cx40 resultiert möglicherweise in eine Differenzierung in Richtung invasiven Phänotyp. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Rolle von Cx40 für die Proliferation des extravillösen Trophoblasten.

Cx43 führte dagegen in den Jeg3-Zellen zu einer Wachstumsinhibition. Dieser vermutlich durch Cx43 eingeleitete Prozeß der Differenzierung steht auch mit der Cx43-Expression im Synzytiotrophoblasten und in terminal differenzierten Riesenzellen der humanen Plazenta in Zusammenhang. Um diese Befunde weiter zu untermauern, wurde die Produktion von β hCG, einem Marker der Trophoblast-Differenzierung (Kohler et al., 1971; Klimann et al., 1986), in den Jeg3-Tet/Cx-Transfektanten analysiert. Humanes Choriongonadotropin (hCG) ist ein Glykoproteinhormon, das aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut ist. Die β -Kette ist für die Hormonspezifität verantwortlich und wird nahezu ausschließlich in der Plazenta exprimiert (Jameson und Hollenberg, 1993). hCG hält die Produktion von Progesteron während der frühen Schwangerschaft durch eine Stimulierung des Gelbkörpers im Ovar aufrecht. Die Bildung des Synzytiotrophoblasten *in vitro* ist mit einer Zunahme der β hCG-mRNA-Expression korreliert, während extravillöse Trophoblastzellen eine geringe β hCG-Expression aufweisen (Jameson und Hollenberg, 1993; Tarrade et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnten Tendenzen einer höheren β hCG-Sekretion und -mRNA-Expression in den induzierten Cx43-Zellklonen gegenüber den Cx40-Transfektanten nachgewiesen werden. Diese Befunde korrelierten nicht immer direkt mit der Menge an Cx-mRNA und -Protein und dem Grad der Zellkopplung. Keine Unterschiede waren in den induzierten versus uninduzierten Transfektanten zu beobachten. Die Befunde einer höheren β hCG-Produktion in den Cx43-Transfektanten könnten mit einer verstärkten Differenzierung zusammenhängen. Hellmann et al. (1999) konnten durch β hCG-Sekretionsmessungen von Jeg3-Cx-Transfektanten, die unter der Kontrolle des SV40-Promotors standen, aufgrund der starken Varianz in der Cx-Expression der einzelnen Transfektanten ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse erhalten.

Weitere Befunde durch Zellfusionsstudien der hier etablierten Jeg3-Cx-Transfektanten stützen die Ergebnisse dieser Arbeit (Kooperation mit S.J. Lye, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto) (Dunk et al., 2003). In diesen Untersuchungen wiesen weder die parentalen Jeg3-Zellen noch die Tet/Cx40-Transfektanten eine Zellfusion unter Standardkulturbedingungen auf. Auch Kohler et al. (1971) konnten in parentalen Jeg3-Zellen keine Zellfusion unter diesen Bedingungen nachweisen. Nur die Cx43-Transfektanten zeigten, sowohl mit Cx43 unter der Kontrolle des Tet-Promotors als auch des α hCG-Promotors, eine verstärkte Fusionsfähigkeit zu Synzytien (Dunk et al., 2003). Behandlung der Zellen mit db-cAMP (-cAMP erhöht die Trophoblast-Zellfusion-; Wice et al., 1990) erhöhte den prozentualen Anteil an fusionierten Zellen nur in den Cx43-transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß die Zell-Zell-Kommunikation über Cx43 eine wichtige Rolle im Fusionsprozeß der Zytotrophoblastzellen zum Synzytiotrophoblasten spielt. Befunde von Cronier et al. (1994b) bestätigten, daß die Expression von Cx43 eine mögliche Voraussetzung für die Fusion zum Synzytiotrophoblasten ist. Eine Behandlung von kultivierten Zytotrophoblastzellen mit Heptanol, einem Inhibitor der Gap Junction-Kopplung, zeigte eine Abnahme der Synzytiotrophoblast-Bildung (Cronier et al., 1994b).

Die Ergebnisse der morphologischen Analysen der Jeg3-Cx-Tumore in der Nacktmaus decken sich mit den oben genannten Ergebnissen. Dabei wiesen die Cx43-Tumore tendenziell eine größere Zahl an Trophoblast-Riesenzellen im Vergleich zu den Cx40- und Vektorkontroll-Tumoren auf. Diese Befunde deuten auf eine verstärkte Differenzierung in den Cx43-Tumoren hin. Eine Ermittlung der Proliferationsraten der Cx-Tumore mit Hilfe der Ki67-Färbung wird zur Zeit durchgeführt.

Welche Mechanismen an dieser durch Connexine regulierten Proliferation und Differenzierung beteiligt sind, ist Gegenstand derzeitiger Forschungen. Schlüsselfrage ist dabei folgende: Wird die durch Cx43 vermittelte Wachstumskontrolle durch den spezifischen Austausch von wachstumshemmenden Stoffen über die Cx43-Kanäle oder über direkte Signaltransduktionsprozesse möglicherweise durch Interaktion mit anderen Molekülen vermittelt? Zhu et al. (1992) vermuteten, daß wachstumshemmende Faktoren sekretiert werden, da eine Kokultur von parentalen C6-Gliomazellen mit Cx43-transfizierten Zellen zu einer Wachstumsreduktion in den parentalen Zellen führte. Die Verwendung des C-terminal truncierten Cx43-Konstruktes in dieser Arbeit gab Hinweise auf die Bedeutung des Carboxyterminus. Die trCx43-Zellklone ließen im Gegensatz zu den Cx43-Transfektanten keine Reduktion in der Zellproliferation *in vitro* und im Tumorstadium im Vergleich zum uninduzierten Zustand erkennen. Das deutete auf eine mögliche Beteiligung des C-Terminus von Cx43 an der Wachstumshemmung hin. Moorby und Patel (2001) konnten zeigen, daß Cx43 das Zellwachstum unabhängig von der Bildung von Gap Junction-Kanälen

beeinflussen kann. Mit einer ähnlichen C-terminal trunkierten Cx43-Mutante (Cx43-256M; mit c-myc *tag* fusioniert), wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, konnte kein Unterschied im Zellproliferationsverhalten von Neuro2a-Zellen beobachtet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß der C-Terminus von Cx43, der keine Kanalaktivität aufweist, alleine das Wachstum von Neuro2a-Zellen genauso wie das Wildtyp-Cx43 inhibieren kann. Moorby und Patel (2001) schlußfolgerten, daß Cx43 einen direkten Einfluß über den C-Terminus auf das Zellwachstum aufweist. Die Effekte von verschiedenen Cx-Mutanten auf das Zellwachstum, die nicht mit der Zellkopplung korrelierten, konnten auch in anderen Studien mit C6-Gliomazellen und der Ratten-Blasenkarzinomzelllinie BC31 gezeigt werden (Omori und Yamasaki, 1998; Krutovskikh et al., 2000). Cx43 scheint daher duale Funktionen zu haben, zum einen als Kanal und zum anderen als Protein, welches über den C-Terminus an Signalkaskaden beteiligt ist. Diese Aspekte werden im folgenden noch ausführlicher diskutiert.

5.5 Cx-vermittelte Signalkaskade in Jeg3-Cx43-Transfektanten: Assoziation und mögliche Interaktion von Cx43 mit dem Wachstumsregulator NOV

Um Genexpressionsmuster zu identifizieren, die mit dem reduzierten Proliferationsverhalten der Jeg3-Cx43-Transfektanten in Zusammenhang stehen könnten, wurden Gene-Arrays der Cx43-, Cx40- und trCx43-Transfektanten durchgeführt. Die hierarchische Cluster-Analyse ergab die Bildung von zwei Subgruppen mit ähnlichen Genexpressionsmustern, eine Gruppe mit den Cx43-Transfektanten und eine Gruppe, denen die Cx40- und trCx43-Zellklone zugeordnet wurden. Diese Einteilung ließ den Schluß zu, daß möglicherweise der C-Terminus von Cx43 die Signalkaskade der Wachstumsinhibition in den Cx43-Transfektanten vermittelt. Die Trennung in der Cluster-Analyse zwischen den Cx43-Transfektanten und den mit Cx40 bzw. trCx43 transfizierten Jeg3-Zellen konnte mit dem unterschiedlichen *in vitro*-Zellwachstums- und Tumorstadiumsverhalten korreliert werden. Auch die anderen Ergebnisse bezüglich der Fusionsstudien und der β hCG-Messungen zeigten, daß Cx43 an Differenzierungsprozessen und Cx40 an der Aufrechterhaltung der Proliferation beteiligt ist. Die Cluster-Analysen ergaben allerdings keine Trennung in induzierte und uninduzierte Transfektanten. Ein induzierter Zellklon wies immer die größte Ähnlichkeit mit dem uninduzierten Klon auf. Hier waren offensichtlich zu wenige Gene reguliert, um in der Cluster-Analyse zwei Gruppen zu bilden. Die Ergebnisse der vergleichenden Analysen der induzierten versus uninduzierten Cx-Transfektanten bekräftigten diese wenigen Unterschiede in nur höchstens 44% der 9 Paarvergleiche. Es zeigten sich nur Unterschiede in den Genexpressionsmustern zwischen Transfektanten mit verschiedenen Connexin-Kanälen. Die bei den vergleichenden Analysen der Gene-Arrays identifizierten Gene mit einer differentiellen Genexpression könnten eine interessante Rolle in Differenzierungs- und

Signaltransduktionsprozessen spielen. Nur auf einige dieser Gene soll im folgenden näher eingegangen werden.

Die Befunde der Cluster-Analysen und der Proliferationsstudien zeigten, daß möglicherweise der C-Terminus von Cx43 eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt. Gestützt wurden diese Befunde durch die Identifizierung eines möglichen Interaktionspartners von Cx43, dem Wachstumsregulator-Protein NOV. NOV ist ein Mitglied der CCN-Familie und zählt zu den sekretorischen, mit der extrazellulären Matrix assoziierten Proteine (Perbal, 2001). Es wird in vielen Geweben exprimiert wie z.B. im Nervensystem, Niere, Lunge, Knochen und zeigt eine veränderte Expression in vielen Tumoren. Durch semiquantitative RT-PCR konnte die differentielle Genexpression von NOV aus den Gene-Array-Analysen in den Jeg3-Cx-Transfektanten bestätigt werden. Während die Cx43-Transfektanten eine im Mittel bis zu 2,6fach signifikante Hochregulation gegenüber den uninduzierten Zellen aufwiesen, zeigten die Cx40-Transfektanten z.T. eine Herunterregulation und die trCx43-Zellklone keine Regulation der NOV-Expression.

Anhand der Gene-Array-Analysen konnte NOV in keinem der Zellklone im *detection call* als vorhanden detektiert werden. Dies kann zum einen durch die geringe Sensitivität der Array-Analyse im Vergleich zur RT-PCR erklärt werden. Eine weitere Ursache könnte in den *probe sets* der Affymetrix-Arrays liegen. Diese enthalten meistens eine Sequenz aus der 3'-UTR (Murphy, 2002). Auch die *probe sets* zur Detektion von NOV, ZO-1 und Occludin enthielten Sequenzen aus der 3'-UTR. Diese Region kann in der mRNA durch Degradation durch Ribonukleasen verloren gehen. Da bekannt ist, daß die 3'-UTR-Regionen vieler mRNA's, besonders instabiler mRNA's, zunehmend degradiert werden (Ross, 1996), könnten diese Gene aus diesem Grunde im Array nicht detektiert werden. In der Literatur sind Nicht-Übereinstimmungen zwischen Array- und RT-PCR-Ergebnissen mit falsch-positiven sowie falsch-negativen Resultaten schon beschrieben worden (Knight, 2001; Cook et al., 2002; Cook und Rosenzweig, 2002). Dabei werden sowohl fehlerhafte Sequenzen in den *probe set*-Oligonukleotiden als auch Kreuzhybridisierungen durch Splice-Varianten, verwandte Gene oder Pseudogene als mögliche weitere Ursachen diskutiert. Daher ist es notwendig, die durch die Array-Analysen erhaltenen Ergebnisse mit Hilfe anderer Methoden zu überprüfen.

Neben der Hochregulation von NOV in den Cx43-Zellklonen konnte nach Induktion der Cx43-Expression durch Dox eine Kolokalisation von NOV und Cx43 an der Zellmembran mit Hilfe der Doppel-Immunfluoreszenz im Laserscan-Mikroskop beobachtet werden. In den uninduzierten Cx43-Transfektanten und in den parentalen Jeg3-Zellen wurde NOV nicht an der Zellmembran, sondern vor allem im Zellkern und z.T. im Zytoplasma detektiert. Zudem konnte in den parentalen Jeg3-Zellen nur eine geringe Expression von NOV auf der Transkript-Ebene in der RT-PCR nachgewiesen werden. Der *turnover* des NOV-Proteins

konnte in einer Zeitreihe von einer induzierten Cx43-Transfektante nach Dox-Entzug verifiziert werden. Nach 24 h Dox-Entzug konnte keine Kolokalisation von NOV und Cx43 mehr an der Zellmembran in der Doppel-Immunfluoreszenz gezeigt werden. Es konnte keine Cx43-Expression mehr beobachtet werden, nur noch eine NOV-Expression im Zellkern und im Zytoplasma. Auch RT-PCR-Analysen bestätigten die Abnahme der NOV-Expression nach Dox-Entzug. Diese korrelierte mit der Reduktion der Cx43-Expression. Interessant war, daß weder die induzierten Cx40- noch die induzierten trCx43-Klone eine derartige Kolokalisation mit NOV aufwiesen. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß die Assoziation von NOV und Cx43 spezifisch ist und möglicherweise der C-Terminus von Cx43 mit dem NOV-Protein interagiert.

Mögliche Funktionen von NOV in den Jeg3-Cx-Transfektanten

Die erhaltenen Befunde werden durch Studien anderer Arbeitsgruppen gestützt. Auch in C6-Gliomazellen wurde nach Transfektion mit Cx43 mittels der *Differential Display*-Methode eine Hochregulation von NOV gezeigt (McLeod et al., 2001; Gupta et al., 2001). Die NOV-Expression war dabei abhängig von der Stärke der Cx43-Expression. Diese Korrelation konnte bei der Analyse der Jeg3-Cx43-Transfektanten nicht beobachtet werden. Zudem konnten McLeod et al. (2001) ebenfalls eine Kolokalisation von Cx43 und NOV an der Zellmembran nachweisen. Parentale C6-Gliomazellen zeigten dagegen keine Expression von NOV im Northern-Blot. In der Immunhistochemie konnte NOV in diesen Zellen im Zellkern lokalisiert werden. Jedoch untersuchte diese Arbeitsgruppe weder den Einfluß anderer Connexin-Isoformen auf die NOV-Expression, insbesondere auch von mutierten Connexinen, noch verwendeten sie induzierbare Systeme. Gupta et al. (2001) diskutierten einen möglichen Einfluß von NOV auf die Funktion und Bildung von Gap Junctions. Möglicherweise ist NOV an der Reorganisation von Zell-Zell-Kontakten involviert, die eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen. NOV weist neben proliferationsstimulierenden, z.B. in 3T3 Fibroblasten (Liu et al., 1999), auch negative wachstumsregulatorische Fähigkeiten auf, die seine Funktion als Tumorsuppressor deutlich machen (Gupta et al., 2001). In embryonalen Huhn-Fibroblasten sowie im Glioblastom konnte NOV als ein antiproliferatives Protein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Joliot et al., 1992; Scholz et al., 1996; Gupta et al., 2001). Gupta et al. (2001) konnten zeigen, daß stabil mit NOV transfizierte Gliomazellen sowohl eine Proliferationsreduktion *in vitro* als auch eine Tumorreduktion in der Nacktmaus aufwiesen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Cx43- und NOV-Expression wurde durch den Befund bekräftigt, daß eine Transfektion mit Cx43 in C6-Gliomazellen auch zu einer Proliferationsreduktion *in vitro* führte (Zhu et al., 1991a).

In Rahmen dieser Arbeit konnte in *in vitro*-Proliferationsstudien von drei Jeg3-Zellklonen nach Transfektion mit NOV ebenfalls eine starke Proliferationsreduktion im Vergleich zu den

parentalen Jeg3-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte die antiproliferative Wirkung von NOV auf die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3.

Eine wichtige Rolle für die biologischen Eigenschaften von NOV spielt dessen subzelluläre Lokalisation und Struktur (Perbal, 2001). Wenn NOV als *full length* Protein sekretiert wird oder an der Zellmembran verbleibt, weist es wachstumsinhibitorische Fähigkeiten auf (Perbal, 1999, 2001). Eine N-trunkierte Form von NOV wurde im Zellkern von Tumorzellen wie HeLa-Zellen und Osteosarkomzellen gefunden (Perbal et al., 1999). Die nukleäre Lokalisation deutet auf eine mögliche Beteiligung von NOV an der Genregulation hin und führt zu einer Wachstumsstimulation. Eine N-Trunkierung von NOV durch MAV-Insertion induzierte in embryonalen Fibroblasten des Huhns eine Transformation (Joliot et al., 1992). Eine direkte Translokation der N-trunkierten Form von NOV in den Zellkern konnte jüngst mit GST-Fusionskonstrukten bestätigt werden (Perbal, persönliche Mitteilung). Wahab et al. (2001) konnten auch für CTGF (*connective tissue growth factor*), einem weiteren Mitglied der CCN-Familie, einen Transport in den Zellkern in humanen Mesangiumzellen nachweisen. Dieser Transport erfolgte nach der Sekretion des Wachstumsfaktors und Wiederaufnahme in die Zellen. Der Mechanismus, wie es zu der Lokalisation von NOV im Zellkern kommen könnte, wurde von Perbal (2001) beschrieben. Das *full length* Protein wird für die Sekretion zur Zellmembran transportiert. Der N-Terminus wird entweder an der Membran oder im extrazellulären Raum abgespalten. Das N-trunkierte Protein wird dann wieder über einen bisher unbekannten Rezeptor oder direkt zurück in die Zelle in den Zellkern transportiert.

Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen der Jeg3-Cx-Transfektanten. In den uninduzierten Cx43-Transfektanten, in den parentalen Jeg3-Zellen sowie den Cx40- und trCx43-Zellklonen konnte NOV immunhistochemisch vor allem im Zellkern und z.T. im Zytoplasma detektiert werden. Erste Experimente zeigen, daß vermutlich hier die N-trunkierte Form von NOV vorliegt. Damit könnte NOV im Zellkern über Transkriptionsfaktoren das Wachstum der Zellen stimulieren. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Proliferationsstudien dieser Transfektanten. Nach Induktion der Cx43-Expression ist NOV an der Zellmembran lokalisiert und interagiert möglicherweise mit dem C-Terminus von Cx43. Durch die Assoziation mit Cx43 wird NOV in der Zelle gehalten und vor einer Proteolyse an der Membran oder im extrazellulären Raum geschützt. Dies führt dann über einen bisher unbekannten Mechanismus zu der Wachstumsinhibition. Es bleibt jedoch zu klären, welche Formen (*full length* oder N-trunkierte Form) von NOV vor und nach der Induktion von Cx43 vorliegen und ob diese differentiell exprimiert werden. Auch NOV scheint wie Connexine duale Funktionen als sekretiertes mit der extrazellulären Matrix assoziiertes Protein und als nukleärer Transkriptionsfaktor aufzuweisen.

Die Analyse der NOV-Expression in den Jeg3-Cx-Tumoren zeigte eine Hochregulation von NOV in den untersuchten Cx43-Tumoren im Vergleich zu den Tumoren der Vektorkontrolle

und den Cx40-Tumoren. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem reduzierten Tumorwachstumsverhalten der Cx43-Transfektanten und deuten auch einen möglichen Einfluß von NOV auf das *in vivo*-Verhalten der Cx43-Zellklone an.

NOV-Expression in der humanen Plazenta

Die Analyse des NOV-Genexpressionsmusters in benignen Trophoblastzellen der reifen humanen Plazenta zeigte im Vergleich zur malignen Trophoblastzelllinie Jeg3 eine im Mittel 2,6fach stärkere NOV-Expression in der RT-PCR. In der Immunhistochemie konnte NOV in invadierenden Trophoblastzellen, im Synzytiotrophoblasten, in der Dezidua und in embryonalen Gefäßen im Zytoplasma nachgewiesen werden. In den invadierenden Trophoblastzellen war NOV im oberen Bereich der Dezidua stark exprimiert. Im invadierenden Trophoblasten der tieferen Dezidua konnte eine Abnahme der NOV-Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Keine NOV-Expression konnten Kocialkowski et al. (2001) in humanen Plazenten von 8-10 Wochen alten Embryonen nachweisen. Auch Burren et al. (1999) stellten keine NOV-Expression in der Plazenta fest, machten jedoch keine Angaben über das Alter der Plazenta. Die in dieser Arbeit gezeigte starke zytoplasmatische Expression von NOV in der Plazenta gegenüber der schwächeren nukleären Expression in den malignen Jeg3-Zellen wies wiederum auf eine mögliche Wachstumskontrolle von NOV hin. Unkontrollierte Zellproliferationen in der Plazenta könnten so verhindert werden. Invadierende Trophoblastzellen dagegen zeigten in tieferen Schichten der Dezidua eine geringere NOV-Expression. Diese Befunde korrelieren mit Untersuchungen an adrenokortikalen Tumoren (Martinerie et al., 2001). Hier zeigten benigne Tumore eine hohe Expression von NOV, die mit einer erhöhten Zelladhäsion assoziiert ist, während eine geringere Expression von NOV in malignen Tumoren in einer erhöhten Zellinvasivität involviert sein könnte.

Interaktionspartner von NOV

Es sind bereits einige weitere Proteine, die mit NOV interagieren, bekannt. Die Interaktion von NOV über die C-terminale Domäne mit dem extrazellulären Matrixmolekül Fibulin-1c weist auf eine Beteiligung von NOV in der Zelladhäsion hin (Perbal et al., 1999). Fibulin-1c spielt eine große Rolle in der Regulation der Zelladhäsion. NOV induziert dabei direkt oder indirekt die Regulation der Fibulin-1c-Expression. Fibulin-1c bindet extrazelluläre Matrixmoleküle wie Fibronectin, Laminin, Nidogen und Fibrinogen (Gupta et al., 2001). Möglicherweise beeinflusst NOV die Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix über Moleküle wie Fibulin-1c. Einen möglichen Einfluß von NOV auf die Regulation der Transkription im Zellkern zeigte die Assoziation mit rpb7, einer Untereinheit der RNA-Polymerase II (Perbal, 1999). Desweiteren wurde eine Interaktion von NOV mit Notch1 identifiziert (Sakamoto et al., 2002). NOV interagiert über die C-terminale Domäne mit

Notch1 und inhibiert die Differenzierung von Myoblasten über den Notch-Signalweg. Der komplexe Notch-Signalweg ist an der normalen Entwicklung vieler Gewebe und Zelltypen durch einen Einfluß auf Differenzierung, Überleben und Proliferation beteiligt (Allenspach et al., 2002). Der Notch-Signalweg ist für die Aufrechterhaltung des unreifen proliferativen Zustandes von Vorläuferzellen essentiell. Notch ist ein transmembranes Signalprotein. Nach Ligandenbindung wird die intrazelluläre Domäne von Notch abgespalten und zum Zellkern transportiert (Übersicht: Mumm und Kopan, 2000). Dort führt Notch zu einer Hochregulation der Transkriptionsfaktoren HES1 und HES5. Die Promotoren dieser Transkriptionsfaktoren werden von NOV aktiviert. In C2/4-Myoblasten führte eine erhöhte Expression von NOV zu einer Herunterregulation von MyoD und Myogenin. Dies resultierte in einer Suppression der Myogenese (Sakamoto et al., 2002). Der positive Einfluß von NOV auf den Notch-Signalweg fördert den inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung der Myoblasten.

Diese Interaktionen mit den erwähnten Proteinen lassen vermuten, daß auch NOV mit seiner C-terminalen Domäne mit Cx43 interagiert. Zudem wird deutlich, wie stark NOV in die Prozesse der Zelladhäsion, der transkriptionellen Regulation und der Signaltransduktion involviert ist. Die in dieser Arbeit identifizierte Kolokalisation ausschließlich mit Cx43 und nicht mit Cx40 und dem C-terminal trunkeierten Cx43 deutet an, daß NOV über die Interaktion mit dem C-Terminus von Cx43 für die Proliferationsreduktion der Cx43-Transfektanten verantwortlich sein könnte. Es stellt sich nun die Frage, wie bzw. über welchen Mechanismus NOV mit dem C-Terminus von Cx43 interagieren könnte. Dazu soll zunächst näher auf die Regulation von Gap Junction-Kanälen eingegangen werden.

5.6 Regulation der Gap Junction vermittelten Kommunikation und weitere mögliche Interaktionspartner von Connexinen aus den Gene-Array-Analysen

Regulation der Gap Junction-Kommunikation

Viele Untersuchungen haben sich mit der Regulation der Gap Junction-Kanäle und der damit verbundenen Signalkaskade beschäftigt. Aufgrund der Vielfältigkeit der Kanäle und der Komplexität der bei der Regulation ablaufenden Prozesse ist dieses Gebiet Gegenstand intensiver Forschung. Eine herausragende Rolle kommt dabei dem C-Terminus der Connexine zu. Die Leitfähigkeit und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit von Gap Junction-Kanälen kann durch eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. durch Ionen wie H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^+ , lipophile Substanzen (z.B. Heptanol), ATP, cAMP, IP_3 , Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF (*platelet-derived growth factor*)) reguliert werden (Bruzzone et al., 1996; Dhein, 1998). Ein Anstieg der intrazellulären Kalzium- und Protonenkonzentration (pH_i) führt zum Verschluß der Kanäle (Loewenstein et al., 1966). Als Mechanismus, der zum Verschluß der Kanäle führt, wurde das *ball-and-chain* Modell der Inaktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Hoshi et al., 1990) vorgeschlagen (Morley et al., 1996). Dabei dient die

carboxyterminale Domäne als Partikel (*ball*), der z.B. bei einem intrazellulären Protonenanstieg die Gap Junction-Kanalpore verschließt. Dieser Partikel bindet intrazellulär an eine spannungssensitive Rezeptordomäne des Cx-Proteins im Bereich der Kanalöffnung. Als intrazelluläre Kette (*chain*) verbindet dabei die carboxyterminale Domäne Partikel und Rezeptor.

Intensiv wurde die Phosphorylierung des C-Terminus, besonders von Cx43, und deren Bedeutung für die Regulation von Gap Junctions untersucht (Übersicht: Lampe und Lau, 2000). Neben der Regulation des Öffnungszustandes der Kanäle wird der Phosphorylierung auch eine Bedeutung bei der Wachstumsregulation zugesprochen. Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF konnte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von Cx43 und eine Inhibition der Gap Junction-Kopplung festgestellt werden (Lau et al., 1992; Hossain et al., 1998). Diese posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung erfolgt an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten. Die Phosphorylierung kann kinase-, connexin- und gewebespezifisch erfolgen (Bruzzone et al., 1996). Mit Ausnahme von Cx26 (Saez et al., 1986) sind alle anderen untersuchten Connexine Phosphoproteine (Evans und Martin, 2002). Die an diesem Prozeß beteiligten Kinasen sind: Proteinkinase C (PKC α und PKC ϵ), cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase G (PKG), Tyrosin-Kinasen (z.B. pp60^{src}) und *mitogen-activated* Proteinkinase (MAP-Kinase) (Dhein, 1998; Dhein et al., 2002).

Der in dieser Arbeit untersuchte trCx43-Kanal zeigt eine Beeinträchtigung der Regulation über ein Öffnen und Schließen des Kanals als Antwort auf Azidifizierung, Behandlung mit Insulin, *Insulin-like growth factor-1* und v-Src (*ball-and-chain model of fast gating*) (Maass, persönliche Mitteilung). Das korrelierte auch mit dem zellphysiologischen Verhalten der trCx43-Zellklone im Vergleich zu den Cx43-Transfektanten. Moorby (2000) konnte nachweisen, daß eine ähnliche C-terminal trunkierte Cx43-Mutante (Cx43-256M) die Inhibition der Gap Junction-Kopplung über v-Src unterbindet.

Viele Phosphorylierungsstudien wurden an Herz-Gap Junctions durchgeführt und zeigten die physiologische Bedeutung der Cx-vermittelten Signalkaskade (Übersicht: Dhein et al., 2002). Burt und Spray (1988) konnten zeigen, daß eine Aktivierung der PKA die Gap Junction-Kopplung in Herzmyozyten erhöht. Im Myokard des Herzens befinden sich Gap Junctions vorzugsweise in den Glanzstreifen und gewährleisten eine synchrone Kontraktion des Arbeitsmyokards (Spray und Burt, 1990). Bei einer Hypoxie, Ischämie oder Azidose z.B. nach einem Myokardinfarkt kommt es zu einem teilweisen Verschluß der Gap Junction-Kanäle, vermutlich durch Dephosphorylierung von Cx43. Dies führt zu Herzrhythmusstörungen (Beardslee et al., 2000). Durch die Gabe von antiarrhythmischen Peptiden konnte das verhindert und die Gap Junction-Leitfähigkeit durch Phosphorylierung von Cx43 durch PKC erhöht werden (Müller et al., 1997).

Weitere Interaktionspartner von Connexinen

Eine weitere Rolle in der Regulation der Kommunikation über Gap Junctions spielen die erwähnten Protein-Protein-Interaktionen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten neben NOV in den Gene-Array-Analysen der Cx-Transfektanten noch andere Gene wie α -Tubulin, β -Catenin und Caveolin-2 als differentiell exprimiert ermittelt werden. Diese könnten an der Cx-vermittelten Signalkaskade beteiligt sein. Dabei scheint in fast allen Fällen der C-Terminus die Signaltransduktion zu vermitteln. Bis jetzt konnten 3 Proteine in der Literatur identifiziert werden, die an den C-Terminus von Cx43 binden. Die c-Src Kinase (Tyrosin-Kinase) kann bei Aktivierung an den C-Terminus von Cx43 über SH2-Domänen binden und Tyrosin phosphorylieren (Giepmans et al., 2001b; Toyofuku et al., 2001). Die Bindung an den Carboxyterminus führt zu einer Inhibition der Gap Junction-Kopplung über einen Mechanismus ähnlich wie für v-Src beschrieben wurde (Kanemitsu et al., 1997).

Ferner interagiert der C-Terminus von Cx43 mit der zweiten PDZ-Domäne von ZO-1 (Giepmans und Moolenaar, 1998; Toyofuku et al., 1998). ZO-1 ist ein zytosolisches Tight Junction-Protein, das transmembrane Proteine wie Occludin, Claudin und JAM (*junctional adhesion molecule*) zum Aktin-Zytoskelett transportiert. ZO-1 ist auch an Signaltransduktionen beteiligt (Reichert et al., 2000). Das C-terminale Isoleucin von Cx43 ist für die Bindung von ZO-1 essentiell (Giepmans und Moolenaar, 1998). Zudem ist die Bindung von ZO-1 von der Integrität des C-Terminus abhängig (Giepmans et al., 2001c). Es wurde vermutet, daß der Komplex Cx43 / ZO-1 als Gerüst dient, um regulatorische Proteine zu den Gap Junction-Plaques zu rekrutieren (Giepmans und Moolenaar, 1998).

Eine Analyse der ZO-1-Expression in den mit Cx43 transfizierten Jeg3-Zellen mittels RT-PCR und Immunhistochemie ergab eine starke Expression von ZO-1 sowohl vor als auch nach Dox-Induktion der Cx43-Expression. Auch die anderen Cx-Transfektanten zeigten keine Veränderungen der ZO-1-Expression nach Dox-Induktion. Dies schließt wahrscheinlich eine mögliche Beteiligung von ZO-1 an dem Komplex Cx43 / NOV in den Jeg3-Zellen aus. Die Arbeitsgruppe, die eine Kolo-kalisation von NOV und Cx43 in Cx43-transfizierten Gliomazellen beschrieben hat (McLeod et al., 2001), postulierte dagegen eine mögliche Beteiligung von ZO-1 (Naus, persönliche Mitteilung). Hierbei soll ZO-1 über PDZ-Domänen NOV binden und zum Cx43-Protein transportieren. NOV besitzt Bindungsmotive wie T/SXV (Songyang et al., 1997), über die PDZ-Domänen in ZO-1 binden können. Da die Ergebnisse dieser Arbeit eher eine Beteiligung von ZO-1 an dem Komplex Cx43 / NOV ausschließen, ist die Frage, wie NOV über die CT-Domäne an den C-Terminus von Cx43 bindet. NOV könnte zum einen über die oben genannten Bindungsstellen an mutmaßliche PDZ-Domänen im C-Terminus von Cx43 (Schubert et al., 2002) binden. Umgekehrt wäre auch eine Bindung über eigene PDZ-Domänen oder SH2-/SH3-Domänen denkbar, die jedoch bisher nicht bekannt sind. Cx43 besitzt im C-Terminus eine prolinreiche Sequenz, die die SH3-Domäne von v-Src

bindet (Kanemitsu et al., 1997). Die letzten 5 Aminosäuren (DDLEI) von Cx43 binden die zweite PDZ-Domäne von ZO-1 (Giepmans und Moolenaar, 1998).

Außerdem konnten Giepmans et al. (2001a) eine Interaktion zwischen dem C-Terminus von Cx43 und α - und β -Tubulin nachweisen. Dabei bindet β -Tubulin an die juxtamembranäre Domäne des C-Terminus von Cx43. α - und β -Tubulin bilden ein Heterodimer, das zu Mikrotubuli polymerisiert. Giepmans et al. (2001c) vermuteten, daß dieser Komplex zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli in kontaktierenden Zellen führt. α -Tubulin wurde interessanterweise als hochreguliertes Gen (im Mittel 2,5fach) im Gene-Array in allerdings nur 3 von 9 Vergleichen in den induzierten trCx43-Transfektanten gegenüber den uninduzierten Zellen gefunden. α -Tubulin könnte ein potentieller Interaktionspartner von Cx43 sein. Durch den Verlust des C-Terminus in diesen Transfektanten geht möglicherweise die potentielle Bindungsstelle von α -Tubulin verloren. Dies könnte ein Grund für die Regulation von α -Tubulin in diesen Zellen sein.

Ferner konnte eine Kolo-kalisation und mögliche Interaktion zwischen Cx43 und dem extrazellulären Matrixmolekül β -Catenin in einem Komplex mit Wnt-1 in Herzmyozyten nachgewiesen werden (Ai et al., 2000). Cx43 wird durch das sekretierte Signalmolekül Wnt-1 hochreguliert und kolo-kalisiert mit β -Catenin in der Plasmamembran. Damit ist β -Catenin nicht mehr als nukleärer Transkriptionsfaktor verfügbar. β -Catenin weist zwei unterschiedliche Funktionen auf. Zum einen ist es mit der Plasmamembran assoziiert, agiert als ein Bestandteil von Zelljunctionen und interagiert mit E-Cadherin. Zum anderen kann es in den Zellkern migrieren und die Transkription regulieren (Bullions und Levine, 1998). Jüngste Studien mit Ratten-Herzmyozyten zeigten die Bildung eines Komplexes aus ZO-1, α - und β -Catenin und Cx43 und postulierten, daß eine Bindung von Cateninen und ZO-1 für den Transport von Cx43 zur Zellmembran während der Bildung von Gap Junctions notwendig ist (Wu et al., 2003). Eine mögliche Beteiligung des β -Catenin-Signalweges durch eine Interaktion mit Cx43 ließen die Gene-Array-Analysen vermuten. β -Catenin wurde in induzierten Cx43- versus Cx40-Transfektanten in 6 von 9 Vergleichen im Mittel 3,9fach signifikant hochreguliert. Dagegen zeigten die induzierten Cx40- versus trCx43-Transfektanten eine im Mittel 4,4fach signifikante Herunterregulation von β -Catenin in 6 von 9 Vergleichen.

Als weiterer Interaktionspartner von Connexin-Proteinen ist das Tight Junction-Molekül Occludin bekannt. Kojima et al. (1999) konnten eine Kolo-kalisation und Interaktion von Cx32 und Occludin in Cx32-transfizierten Hepatozyten nachweisen. Die Autoren vermuteten, daß die Expression von Cx32 die Zellpolarität durch Modifikationen der Tight Junction-Expression beeinflußt und dabei an der Differenzierung von Epithelzellen beteiligt sein könnte (Kojima et al., 2001). Kojima et al. (2002) zeigten mit dem Einsatz von C-terminal trunkierten Cx32-

Konstrukten, daß die Interaktion zwischen Cx32 und Occludin möglicherweise über den C-Terminus erfolgt.

Eine Analyse der Occludin-Expression in den Jeg3-Cx-Transfektanten mittels der Gene-Array-Analyse deutete auf eine Hochregulation in den induzierten Cx43- und Cx40-Transfektanten gegenüber den uninduzierten Zellklonen hin. Diese Tendenzen einer Hochregulation konnten jedoch mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR nur in einem Cx43-Klon (Tet/Cx43/#20) verifiziert werden. Die anderen analysierten Transfektanten wiesen keine Regulation der Occludin-Expression auch auf der Protein-Ebene nach Dox-Gabe auf. Occludin wurde sowohl von parentalen Jeg3-Zellen als auch von Jeg3-Cx-Transfektanten unabhängig vom Connexin-Typ gleichermaßen exprimiert. Ob die transfizierten Connexine in den Jeg3-Zellen mit Occludin und ZO-1 an der Zellmembran kolokalisiert vorliegen und interagieren, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Außerdem wurde kürzlich die Interaktion von Connexinen mit Caveolin-1, einem integralen Membranprotein von vesikulären Invaginationen (Caveolae), identifiziert (Schubert et al., 2002). Caveolae sind Orte der Transzytose und Signaltransduktion. Sie werden primär in terminal differenzierten Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Adipozyten gefunden (Schubert et al., 2002). Die Familie der Caveoline besteht aus drei Mitgliedern: Caveolin-1, -2 und -3. Caveoline agieren als Gerüstproteine, um Lipide und Signalmoleküle zu Caveolae zu transportieren und diese gegebenenfalls zu regulieren. Auch viele Ionenkanäle sind in diesen Invaginationen lokalisiert und interagieren mit Caveolinen. Schubert et al. (2002) konnten eine spezifische Interaktion von Cx43 mit Caveolin-1 nach dem Transport zu Caveolae nachweisen. Die mutmaßlichen PDZ- und SH2/SH3-Bindungsdomänen des C-Terminus von Cx43 scheinen nicht an der Interaktion mit Caveolin-1 beteiligt zu sein (Schubert et al., 2002). Die Ergebnisse der Gene-Arrays zeigten eine differentielle Genexpression von Caveolin-2. Es konnte im Durchschnitt eine 2,1fache Hochregulation in 3 von 9 Vergleichen der induzierten trCx43-Transfektanten versus den uninduzierten Zellklonen detektiert werden. Zudem wurde Caveolin-2 signifikant im Mittel 3,4fach in 5 von 9 Vergleichen in den induzierten Cx43-Klonen gegenüber den induzierten trCx43-Transfektanten herunterreguliert. Möglicherweise agiert der C-Terminus als potentielle Bindungsstelle von Caveolin-2. Durch den Verlust des C-Terminus in den trunkierten Cx43-Zellklonen wird die Genexpression von Caveolin-2 in den Zellen auch im Vergleich zu den Cx43-Transfektanten hochreguliert. Eine Interaktion zwischen Connexinen und Caveolin-2 und eine mögliche Rolle von Caveolin-2 in dem Transport von Connexinen zu den Caveolae ist jedoch bisher nicht bekannt. Die Regulation der Caveolin-2-Expression ist noch aus einem weiteren Grund interessant. Lyden et al. (2002) konnten eine Expression von Caveolin-1 und -2 in der reifen Plazenta nur im Endothel und nicht in den Trophoblastzellen

detektieren. Das könnte auf eine bisher noch unbekannte Regulation der Caveoline während der Trophoblast-Differenzierung hindeuten.

Die Studien dieser Arbeit machen die Vielfältigkeit und Komplexität der Gap Junction-Kommunikation und die Beteiligung möglicher Interaktionspartner, die diese modulieren können, deutlich. Einen vielversprechenden Kandidaten für die Interaktion mit Cx43 stellt NOV dar. NOV könnte über die Bindung an den C-Terminus von Cx43 die Wachstumsreduktion in den Jeg3-Cx43-Transfektanten durch eine intrazelluläre Signalkaskade induzieren.

5.7 Ausblick

In direkt anschließenden Versuchen soll zunächst die Interaktion zwischen dem Wachstumsregulator NOV und dem Carboxyterminus von Cx43 bestätigt werden.

- Verifizierung der Interaktion zwischen Cx43 und NOV mittels der Koimmunpräzipitation oder *Pull-Down-Assay*

Ferner sind noch weitere Experimente geplant:

- Western-Blot-Analysen zur Quantifizierung des NOV-Proteins in Zell-Lysaten der Jeg3-Cx-Transfektanten und parentalen Jeg3-Zellen
- Western-Blot-Analysen zur Charakterisierung der unterschiedlichen NOV-Formen (N-trunkierte Form und *full length* Form) in nukleären, zytoplasmatischen und membranären Fraktionen der Jeg3-Cx-Transfektanten und parentalen Jeg3-Zellen
- RT-PCR-Analysen zur Charakterisierung der unterschiedlichen NOV-mRNA's (N-trunkiertes NOV und *full length* NOV)
- Funktionsanalysen zur Untersuchung, ob das *full length* NOV durch Cx43 hochreguliert und das nukleäre NOV herunterreguliert wird: Welche der beiden Formen von NOV führt in diesem System zu einer Proliferationsinhibition bzw. -stimulation?
- Analyse der Cx43 / NOV vermittelten Signalkaskade

6 Zusammenfassung

Gap Junction-Kanäle spielen eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Die bei dieser Kontrolle durch Connexine ablaufenden Regulationsmechanismen sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit wurde daher die humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3, die maligne Form des Trophoblasten, mit verschiedenen Connexin-Genen stabil transfiziert, um den Einfluß verschiedener Gap Junction-Kanäle auf das Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsverhalten des Trophoblasten zu analysieren. Die Jeg3-Chorionkarzinomzellen dienen als Modell für den frühen proliferativen Trophoblasten und sind kommunikationsdefizient. Die Untersuchung fokussierte sich auf den Cx43- und Cx40-Kanal, da diese beiden Connexine unterschiedliche Funktionen in der Trophoblast-Differenzierung besitzen. Dabei übernimmt Cx40 vermutlich die Aufrechterhaltung der Proliferation, während Cx43 im Prozeß der Differenzierung zum Synzytiotrophoblasten involviert ist. Ein C-terminal trunkiertes Cx43-Konstrukt (trCx43) wurde eingesetzt, um den Einfluß des C-Terminus auf Signaltransduktionsprozesse zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten induzierbare Jeg3-Cx-Transfektanten (Cx43, Cx40, Cx26, trCx43) unter der Kontrolle des Tet-On-Systems und Cx43-Transfektanten mit dem zellspezifischen α hCG-Promotor etabliert und hinsichtlich ihres Cx-Expressionsmusters und funktionellen Kopplungsgrades charakterisiert werden.

Ferner wurden Analysen des Invasionsverhaltens der Cx-transfizierten Jeg3-Zellen durchgeführt. Dazu wurde die heterologe Kopplungsfähigkeit der verschiedenen Jeg3-Cx-Transfektanten mit der Maus-Endothelzelllinie bEnd3 *in vitro* untersucht. Während die mit Cx43 transfizierten Jeg3-Zellen mit den Endothelzellen heterolog koppeln konnten, unterblieb diese Kopplung bei den Cx26-Zellklonen. Untersuchungen des *in vivo*-Invasionsverhaltens der verschiedenen Cx-Transfektanten in Tumoren von Nacktmäusen zeigten nur wenige Unterschiede. Die Cx43-Tumore wiesen tendenziell mehr Cx43-positive Riesenzellen als die Cx40-Tumore auf. Es waren keine Veränderungen in der Ausbildung / Einsprossung von Gefäßen sowie in der Integrin-Expression der Tumore zu erkennen. Der einzige Unterschied war eine höhere Expression des EGF-Rezeptors in den Cx43-Tumoren.

Zellphysiologische Untersuchungen der verschiedenen Cx-Transfektanten zeigten Unterschiede im Proliferationsverhalten. Eine Wiederherstellung der Zell-Zell-Kommunikation über den Cx43-Kanal führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation *in vitro* und des Tumorwachstums in Nacktmäusen. Dagegen wiesen die Cx40- und trCx43-Transfektanten kein reduziertes Wachstumsverhalten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf, sondern zeigten teilweise in den Nacktmausversuchen ein verstärktes Tumorwachstum.

Die Analysen der β hCG-mRNA-Expression und β hCG-Sekretion als Marker für eine verstärkte Differenzierung zeigten Tendenzen zu einer verstärkten β hCG-Produktion in den Cx43-Transfektanten. Zusammenfassend stützen diese Daten die Befunde, daß Cx43 an der Reduktion der Proliferation und an einer Verstärkung der Differenzierung beteiligt ist.

Um die Cx-vermittelte Signalkaskade, die zu dem reduzierten Proliferationsverhalten der Cx43-transfizierten Jeg3-Zellen führt, aufzuklären, wurden Gene-Arrays und semiquantitative RT-PCR-Analysen der Jeg3-Transfektanten durchgeführt. Dabei konnte das Wachstumsregulator-Gen NOV, ein Mitglied der CCN-Familie der sekretierten mit der extrazellulären Matrix assoziierten Proteine, als hochreguliertes Gen in den Cx43-Transfektanten identifiziert werden. In immunhistochemischen Analysen wurde NOV in parentalen Zellen überwiegend im Zellkern nachgewiesen. Nach Induktion von Cx43 in den Tet/Cx43-Transfektanten konnte eine Kolokalisation von NOV und Cx43 an der Zellmembran mittels der Doppel-Immunfluoreszenz beobachtet werden. Keine Kolokalisation war in den induzierten Cx40- und C-terminal trunkierten Cx43-Transfektanten sowie in allen uninduzierten Zellklonen zu detektieren. Dort war NOV nicht an der Zellmembran, sondern vor allem im Zellkern und z.T. im Zytoplasma lokalisiert. Daraus war zu schließen, daß möglicherweise der C-Terminus von Cx43 an der Bindung des NOV-Proteins beteiligt ist. Die Assoziation von NOV und Cx43 an der Zellmembran könnte für die Wachstumsreduktion der Jeg3-Cx43-Transfektanten verantwortlich sein.

Insgesamt sprechen die Befunde dieser Arbeit dafür, daß sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Jeg3-Zellen eng mit der Expression bestimmter Cx-Isoformen verknüpft ist. Zudem wird durch die Assoziation von NOV und Cx43 die Funktion der Connexin-Proteine unabhängig von der Bildung von Gap Junction-Kanälen deutlich und zeigt den zunehmenden Einfluß der Beteiligung anderer Proteine an der Cx-vermittelten Signalkaskade. Auch die Daten der Gene-Array-Analyse sprechen für die Komplexität der Gap Junction vermittelten interzellulären Kommunikation über intrazelluläre Signalkaskaden.

7 Literaturverzeichnis

- Ai, Z., Fischer, A., Spray, D.C., Brown, A.M.C., Fishman, G.I. (2000).** Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 105, 161-171.
- Al-Lamki, R.S., Skepper, J.N., Burton, G.J. (1999).** Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Hum. Reprod.* 14, 496-504.
- Allenspach, E.J., Maillard, I., Aster, J.C., Pear, W.S. (2002).** Notch signaling in cancer. *Cancer Biol. Ther.* 1, 466-476.
- Ara, C., Massimi, M., Conti Devirgiliis, L. (2002).** Retinoic acid modulates gap junctional intercellular communication in hepatocytes and hepatoma cells. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1758-1765.
- Aronow, B.J., Richardson, B.D., Handwerger, S. (2001).** Microarray analysis of trophoblast differentiation: gene expression reprogramming in key gene function categories. *Physiol. Genomics* 6, 105-116.
- Bagshawe, A.D. (1969).** Choriocarcinoma: The clinical biology of the trophoblast and its tumors. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Barrio, L.C., Suchyna, T., Bargiello, T., Xu, L.X., Roginski, R.S., Bennett, M.V.L., Nicholson, B.J. (1991).** Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8410-8414.
- Beardslee, M.A., Lerner, D.L., Tadros, P.N., Laing, J.G., Beyer, E.C., Yamada, K.A., Kleber, A.G., Schuessler, R.B., Saffitz, J.E. (2000).** Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ. Res.* 87, 656-662.
- Benirschke, K., Kaufmann, P. (eds.) (2000).** Pathology of the human placenta. 4th edn. Springer-Verlag, New York.
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Oronzi Scott, M., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F., Fischbeck, K.H. (1993).** Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262, 2039-2042.
- Beyer, E.C., Paul, D.L., Goodenough, D.A. (1987).** Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* 105, 2621-2629.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1515.
- Bräuner, T., Hülser, D.F. (1990).** Tumor cell invasion and gap junctional communication. II. Normal and malignant cells confronted in multicellular spheroids. *Invasion Metastasis* 10, 31-48.
- Bruzzone, R., Haefliger, J.-A., Gimlich, R.L., Paul, D.L. (1993).** Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol. Biol. Cell* 4, 7-20.
- Bruzzone, R., White, T.W., Paul, D.L. (1996).** Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238, 1-27.
- Bryans, M., Kass, S., Seivwright, C., Adams, R.L. (1992).** Vector methylation inhibits transcription from the SV40 early promoter. *FEBS Lett.* 309, 97-102.
- Bullions, L.C., Levine, A.J. (1998).** The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 10, 81-87.
- Burren, C.P., Wilson, E.M., Hwa, V., Oh, Y., Rosenfeld, R.G. (1999).** Binding properties and distribution of insulin-like growth factor binding protein-related protein 3 (IGFBP-rP3/NovH), an additional member of the IGFBP superfamily. *J. Clin. Endo. Metab.* 84, 1096-1103.
- Burres, N.S., Cass, C.E. (1986).** Density-dependent inhibition of expression of syncytiotrophoblast markers by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells. *J. Cell Physiol.* 128, 375-382.
- Burt, J.M., Spray, D.C. (1988).** Inotropic agents modulate gap junctional conductance between cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 254, H1206-H1210.

- Cao, H., Lei, Z.M., Bian, L., Rao, C.V. (1995).** Functional nuclear epidermal growth factor receptors in human choriocarcinoma Jeg3 cells and normal human placenta. *Endocrinology* 136, 3163-3172.
- Cao, F. L., Eckert, R., Elfgang, C., Nitsche, J.M., Synder, S.A., Hülser, D.F., Willecke, K., Nicholson, B.J. (1998).** A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* 111, 31-43.
- Carystinos, G.D., Bier, A., Batist, G. (2001).** The role of connexin-mediated cell-cell communication in breast cancer metastasis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6, 431-440.
- Chang, Y.S., dieTomaso, E., McDonald, D.M., Jones, R., Jain, R.K., Munn, L.L. (2000).** Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14608-14613.
- Chen, H.-W., Chen, J.J.W., Tzeng C.-R., Li, H.-N., Chang, S.-J., Cheng, Y.-F., Chang, C.-W., Wang, R.-S., Yang, P.-C., Lee, Y.-T. (2002).** Global analysis of differentially expressed genes in early gestational decidua and chorionic villi using a 9600 human cDNA microarray. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 475-484.
- Chevalier, G., Yeger, H., Martinerie, C., Laurent, M., Alami, J., Schofield, P.N., Perbal, B. (1998).** novH: Differential expression in developing kidney and wilm' s tumors. *Am. J. Pathol.* 152, 1563-1575.
- Cook, S.A., Matsui, T., Li, L., Rosenzweig, A. (2002).** Transcriptional effects of chronic akt activation in the heart. *J. Biol. Chem.* 277, 22528-22533.
- Cook, S.A., Rosenzweig, A. (2002).** DNA microarrays: implications for cardiovascular medicine. *Circ. Res.* 91, 559-564.
- Copp, A.J. (1995).** Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 11, 87-93.
- Cottrell, G.T., Burt, J.M. (2001).** Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx40 and Cx43 connexons. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1559-C1567.
- Cronier, L., Bastide, B., Traub, O., Herve, J.C., Deleze, J., Malassine, A. (1994a).** Stimulation of connexin expression and gap junctional communication by hCG during human trophoblast differentiation. *Placenta* 15, A.10.
- Cronier, L., Alsat, E., Herve, J.C., Deleze, J., Malassine, A. (1994b).** Inhibition of gap junctional communication, trophoblast differentiation and hCS expression by heptanol in human trophoblast in culture. *Placenta* 15, A.10.
- Cronier, L., Herve, J.C., Deleze, J., Malassine, A. (1997).** Regulation of gap junctional communication during human trophoblast differentiation. *Microsc. Res. Tech.* 38, 21-28.
- Cronier, L., Cantereau, A., DeFamie, N., Batias, C., Traub, O., Pointis, G., Malassine, A. (1999).** Connexin expression in first trimester trophoblast: "in situ" and "in vitro" study. *Placenta* 20, A.20.
- Cronier, L., Bastide, B., Defamie, N., Niger, C., Pointis, G., Gasc, J.M., Malassine, A. (2001).** Involvement of gap junctional communication and connexin expression in trophoblast differentiation of the human placenta. *Histol. Histopathol.* 16, 285-295.
- Cronier, L., Defamie, N., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Goffin, F., Pointis, G., Malassine, A. (2002).** Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human first trimester trophoblast. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 1005-1013.
- Cross, J.C., Werb, Z., Fisher, S.J. (1994).** Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266, 1508-1518.
- Cross, J.C. (2000).** Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11, 105-113.
- Czyz, J., Irmer, U., Schulz, G., Mindermann, A., Hülser, D.F. (2000).** Gap-junctional coupling measured by flow cytometry. *Exp. Cell Res.* 255, 40-46.
- Damsky, C.H., Fitzgerald, M.L., Fisher, S.J. (1992).** Distribution patterns of the extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J. Clin. Invest.* 89, 210-222.

- Damsky, C.H., Librach, C., Lim, K.-H., Fitzgerald, M.L., McMaster, M.T., Janatpour, M., Zhou, Y., Logan, S.K., Fisher, S.J. (1994). Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 120, 3657-3666.
- de Virgiliis, G., Sideri, M., Fumgalli, G., Remotti, G. (1982). The junctional pattern of the human villous trophoblast: A freeze fracture study. *Gynecol. Obstet. Invest.* 14, 263-272.
- Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T.K., Beyer, E., Bennett, M.V.L., Spray, D.C., Willecke, K. (1989). Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10148-10152.
- Dermietzel, R., Spray, D.C. (1993). Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci.* 16, 186-192.
- Deutsch, P.J., Jameson, J.L., Habener, J.F. (1987). Cyclic AMP responsiveness of human gonadotropin-alpha gene transcription is directed by a repeated 18-base pair enhancer. Alpha-promoter receptivity to the enhancer confers cell-preferential expression. *J. Biol. Chem.* 262, 12169-12174.
- Dhein, S. (1998). Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 229-241.
- Dhein, S., Polontchouk, L., Salameh, A., Haefliger, J.-H. (2002). Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40. *Biol. Cell* 94, 409-422.
- Diez, J.A., Ahmad, S., Evans, W.H. (1999). Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. *Eur. J. Biochem.* 262, 142-148.
- Dubina, M.V., Iatckii, N.A., Popov, D.E., Vasil'ev, S.V., Krutovskikh, V.A. (2002). Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene* 21, 4992-4996.
- Dunk, C., Pavri, S., Gellhaus, A., Winterhager, E., Lye, S.J. (2003). Connexin 43 expression increases trophoblast cell fusion: a role in syncytialisation. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10, 198A.
- Eghbali, B., Kessler, J.A., Reid, L.M., Roy, C., Spray, D.C. (1993). Gap junctions and tumorigenesis: transfection of communication-deficient tumor cells with connexin32 retards growth in vivo. In: J.E. Hall, G.A. Zampighi, R.M. Davis (eds.): *Progress in Cell Research*, Elsevier, Amsterdam, 317-320.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hülser, D.F., Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129, 805-817.
- Ellis, P.D., Chen, Q., Barker, P.J., Metcalfe, J.C., Kemp, P.R. (2000). NOV gene encodes adhesion factor for vascular smooth muscle cells and is dynamically regulated in response to vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1912-1919.
- El-Sabban, M.E., Pauli, B.U. (1991). Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cells and vascular endothelium. *J. Cell Biol.* 115, 1375-1382.
- El-Sabban, M.E., Pauli, B.U. (1994-1995). Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis* 14, 164-176.
- Enomoto, T., Yamasaki, H. (1984). Lack of intercellular communication between chemically transformed and surrounding non-transformed BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res.* 44, 5200-5203.
- Evans, W.H., Martin, P.E.M. (2002). Gap junctions: structure and function (review). *Mol. Membr. Biol.* 19, 121-136.
- Evert, M., Ott, T., Temme, A., Willecke, K., Dombrowski, F. (2002). Morphology and morphometric investigation of hepatocellular preneoplastic lesions and neoplasms in connexin32-deficient mice. *Carcinogenesis* 23, 697-703.
- Falk, M.M. (2000). Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *J. Cell Sci.* 113, 4109-4120.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.

- Fernstrom, M.J., Koffler, L.D., Abou-Rjaily, G., Boucher, P.D., Shewach, D.S., Ruch, R.J. (2002). Neoplastic reversal of human ovarian carcinoma cells transfected with connexin43. *Exp. Mol. Pathol.* 73, 54-60.
- Fimpeler, J., Winterhager, E., Grümmer, R. (2001). Characterization of trophoblast cells invading host vessels in a nude mouse model. *Ann. Anat.* 183 (Suppl.), 89-90.
- Fisher, S.J., Damsky, C.H. (1993). Human cytotrophoblast invasion. *Semin. Cell Biol.* 4, 183-188.
- Fishman, G.I., Gao, Y., Hertzberg, E.L., Spray, D.C. (1995). Reversible intercellular coupling by regulated expression of a gap junction channel gene. *Cell Adhes. Commun.* 3, 353-365.
- Folkman, J. (2001). Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 398-400.
- Foote, C.I., Zhou, L., Zhu, X., Nicholson B.J. (1998). The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140, 1187-1197.
- Fussenegger, M. (2001). The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol. Prog.* 17, 1-51.
- Gabriel, H.D., Jung, D., Butzler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E., Willecke, K. (1998). Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* 140, 1453-1461.
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503-507.
- Gerke, M. (2001). Einfluß verschiedener Connexin-Kanäle auf das Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsverhalten der Chorionkarzinomzelllinie BeWo nach stabiler Transfektion. Dissertation, Universität Essen.
- Getsios, S., Chen, G.T.C., Maccalman, C.D. (2001). α -, β -, γ -Catenin, and p120^{CTN} expression during the terminal differentiation and fusion of mononucleate cytotrophoblasts in vitro and in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 168-177.
- Giepmans, B.N.G., Moolenaar, W.H. (1998). The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr. Biol.* 8, 931-934.
- Giepmans, B.N.G., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M.M., Moolenaar, W.H. (2001a). Gap junction protein connexin-43 interacts with microtubules. *Curr. Biol.* 11, 1364-1368.
- Giepmans, B.N.G., Hengeveld, T., Postma, F.R., Moolenaar, W.H. (2001b). Interaction with c-src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J. Biol. Chem.* 276, 8544-8549.
- Giepmans, B.N.G., Verlaan, I., Moolenaar, W.H. (2001c). Connexin-43 interactions with ZO-1 and α - and β -Tubulin. *Cell Commun. Adhes.* 8, 219-223.
- Glukhova, L., Angevin, E., Lavialle, C., Cadot, B., Terrier-Lacombe, M.J., Perbal, B., Bernheim, A., Goguel, A.F. (2001). Patterns of specific genomic alterations associated with poor prognosis in high-grade renal cell carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 130, 105-110.
- Gong, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., Lei, H., Kumar, N.M., Horwitz, J., Gilula, N.B. (1997). Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* 91, 833-843.
- Goodenough, D.A. (1974). Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. *J. Cell Biol.* 61, 557-563.
- Goodenough, D.A. (1976). In vitro formation of gap junction vesicles. *J. Cell Biol.* 68, 220-231.
- Gossen, M., Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.

- Graeber, S.H.M., Hülser, D.F. (1998).** Connexin transfection induces invasive properties in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 243, 142-149.
- Grümmer, R. (1991).** Entwicklung eines *in-vitro*-Modells zur Untersuchung zellbiologischer Mechanismen der Invasion des menschlichen Trophoblasten. Experimentelle Untersuchungen unter Verwendung von Chorionkarzinomzellsphäroiden und Endometrium-Organkultur. Dissertation, RTWH Aachen.
- Grümmer, R., Hohn, H.P., Mareel, M.M., Denker, H.W. (1994).** Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. *Placenta* 15, 411-429.
- Grümmer, R., Donner, A., Winterhager, E. (1999).** Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. *Placenta* 20, 547-553.
- Gupta, N., Wang, H., McLeod, T.L., Naus, C.C.G., Kyurkchiev, S., Advani, S., Yu, J., Perbal, B., Weichselbaum, R.R. (2001).** Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *J. Clin. Pathol: Mol. Pathol.* 54, 293-299.
- Haefliger, J.A., Bruzzone, R., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Paul, D.L. (1992).** Four members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. *J. Biol. Chem.* 267, 2057-2064.
- Hanauer, A., Mandel, J.L. (1984).** The glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase gene family: structure of a human cDNA and of an X chromosome linked pseudogene; amazing complexity of the gene family in mouse. *EMBO J.* 3, 2627-2633.
- Hellmann, P. (1995).** Untersuchungen zur endogenen und exogenen Connexinexpression in verschiedenen humanen Chorionkarzinomzelllinien und deren physiologische Charakterisierung. Dissertation, Universität Essen.
- Hellmann, P., Winterhager, E., Spray, D. (1996).** Properties of connexin40 gap junction channels endogenously expressed and exogenously overexpressed in human choriocarcinoma cell lines. *Eur. J. Cell Physiol.* 432, 501-509.
- Hellmann, P., Grümmer, R., Schirrmacher, K., Rook, M., Traub, O., Winterhager, E. (1999).** Transfection with different connexin genes alters growth and differentiation of human choriocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 246, 480-490.
- Hirschi, K.K., Xu, C.E., Tsukamoto, T., Sager, R. (1996).** Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Differ.* 7, 861-870.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. (1990).** Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250, 533-538.
- Hossain, M.Z., Zhang, L.X., Bertram, J.S. (1993).** Retinoids and carotinoids upregulate gap-junctional communication. In: Hall, J. E., Zampighi, G. A., Davis, R. M. (eds.): *Gap Junctions*. Elsevier, Amsterdam, 301-309.
- Hossain, M.Z., Ao, P., Boyton, A.L. (1998).** Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 by platelet-derived growth factor in T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor. *J. Cell Physiol.* 174, 66-77.
- Hotz-Wagenblatt, A., Shalloway, D. (1993).** Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit. Rev. Oncog.* 4, 541-558.
- Ito, A., Katoh, F., Kataoka, T., Okada, M., Tsubota, N., Asada, H., Yoshikawa, K., Maeda, S., Kitamury, Y., Yamasaki, H., Nojima, H. (2000).** A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. *J. Clin. Invest.* 105, 1189-1197.
- Jameson, J.L., Hollenberg, A.N. (1993).** Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr. Rev.* 14, 203-221.
- Jamieson, S., Going, J.J., D'Arcy, R., George, W.D. (1998).** Expression of gap junction proteins connexin26 and connexin43 in normal human breast and in breast tumours. *J. Pathol.* 184, 37-43.
- Jiang, J.X., Goodenough, D.A. (1996).** Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1287-1291.
- Jokhi, P.P., King, A., Loke, Y.W. (1994).** Reciprocal expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-erbB2 by non-invasive and invasive human trophoblast populations. *Cytokine* 6, 433-442.

- Joliot, V., Martinerie, C., Dambrine, G., Plassiart, G., Brisac, M., Crochet, J., Perbal, B. (1992). Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol. Cell Biol.* 12, 10-21.
- Juul, M.H., Rivedal, E., Stokke T., Sanner, T. (2000). Quantitative determination of gap junction intercellular communication using flow cytometric measurement of fluorescent dye transfer. *Cell Adhes. Commun.* 7, 501-512.
- Kamper, M.R., Gohla, G., Schluter, G. (2002). A novel positive tetracycline-dependent transactivator (rtTA) variant with reduced background activity and enhanced activation potential. *FEBS Lett.* 517, 115-120.
- Kanemitsu, M.Y., Loo, L.W., Simon, A.F., Eckhart, W. (1997). Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions. *J. Biol. Chem.* 272, 22824-22831.
- Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F., Leigh, I.M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387, 80-83.
- Kiang, D.T., Kollander, R., Lin, H.H., LaVilla, S., Atkinson, M.M. (1994). Measurement of gap junctional communication by fluorescence activated cell sorting. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 30A, 796-802.
- Kidder, G.M., Winterhager, E. (2001). Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions. *Front. Biosci.* 6, D731-D736.
- King, T.J., Fukushima, L.H., Hieber, A.D., Shimabukuro, K.A., Sakr, W.A., Bertram, J.S. (2000a). Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in cervical carcinoma cell line decrease neoplastic potential with implications for tumor progression. *Carcinogenesis* 21, 1097-1109.
- King, T.J., Fukushima, L.H., Donlon, T.A., Hieber, A.D., Shimabukuro, K.A., Bertram, J.S. (2000b). Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa cell lines: implications for tumor progression. *Carcinogenesis* 21, 311-315.
- Kliman, H.J., Nestler, J.F., Sermasi, E., Sauger, J.M., Strauss, J.F. III (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118, 1567-1582.
- Knight, J. (2001). When the chips are down. *Nature* 410, 860-861.
- Kocialkowski, S., Yeger, H., Kingdom, J., Perbal, B., Schofield, P.N. (2001). Expression of the human NOV gene in first trimester fetal tissues. *Anat. Embryol.* 203, 417-427.
- Kohler, P.O., Bridson, W.E. (1971). Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32, 683-687.
- Kohler, P.O., Bridson, W.E., Hammond, J.M., Weintraub, B., Kirschner, M.A., Van Thiel, D.H. (1971). Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture. *Acta Endocrinol. Suppl.* 153, 137-153.
- Kojima, T., Yamamoto, M., Tobioka, H., Mizuguchi, T., Mitaka, T., Mochizuki, Y. (1996). Changes in cellular distribution of connexin 32 and 26 during formation of gap junctions in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 223, 314-326.
- Kojima, T., Samada, N., Chiba, H., Kokai, Y., Yamamoto, M., Urban, M., Lee, G.-H., Hertzberg, E.L., Mochizuki, Y., Spray, D.C. (1999). Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin 32 interacts with occludin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 222-229.
- Kojima, T., Kokai, Y., Chiba, H., Yamamoto, M., Mochizuki, Y., Sawada, N. (2001). Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 263, 193-201.
- Kojima, T., Spray, D.C., Kokai, Y., Chiba, H., Mochizuki, Y., Sawada, N. (2002). Cx32 formation and/or Cx32-mediated intercellular communication induces expression and function of tight junctions in hepatocytic cell line. *Exp. Cell Res.* 276, 40-51.
- Krutovskikh, V., Mazzoleni, G., Mironov, N., Omori, Y., Aguelon, A.-M., Mesnil, M., Berger, F., Partensky, C., Yamasaki, H. (1994). Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with

- aberrant protein localization but not gene mutation of connexin32. *Int. J. Cancer* 56, 87-94.
- Krutovskikh, V.A., Troyanovsky, S.M., Piccoli, C., Tsuda, H., Asamoto, M., Yamasaki, H. (2000).** Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 19, 505-513.
- Kumar, N.M., Gilula, N.B. (1996).** The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.
- Kurman, R.J., Main, C.S., Chen, H.C. (1984).** Intermediate trophoblast: a distinct form of trophoblast with specific morphological, biochemical and functional features. *Placenta* 5, 349-370.
- Kwak, B.R., Pepper, M.S., Gros, D.B., Meda, P. (2001).** Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. *Mol. Biol. Cell* 12, 831-845.
- Lala, P.K., Lee, B.P., Xu, G., Chakraborty, C. (2002).** Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 142-149.
- Lamartina, S., Roscilli, G., Rinaudo, C.D., Sporeno, E., Silvi, L., Hillen, W., Bujard, H., Cortese, R., Ciliberto, G., Toniatti, C. (2002).** Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum. Gene Ther.* 13, 199-210.
- Lampe, P.D., Lau, A.F. (2000).** Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 205-215.
- Lau, A.F., Kanemitsu, M.Y., Kurata, W.E., Danesh, S., Boyton, A.L. (1992).** Epidermal growth factor disrupts gap-junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 on serine. *Mol. Biol. Cell* 3, 865-874.
- Lauf, U., Giepmans, B.N.G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.-C., Falk, M.M. (2002).** Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10446-10451.
- Li, C.L., Martinez, V., Hem, B., Lombet, A., Perbal, B. (2002).** A role for CCN3 (NOV) in calcium signaling. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 55, 250-261.
- Lin, J.H.-C., Takano, T., Cotrina, M.L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., Gao, Q., Jiang, L., Li, F., Lichtenberg-Frate, H., Haubrich, S., Willecke, K., Goldman, S.A., Nedergaard, M. (2002).** Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J. Neurosci.* 22, 4302-4311.
- Link, D., Irintchev, A., Knauf, U., Wernig, A., Starzinski-Powitz, A. (2001).** A model for studying postnatal myogenesis with tetracycline-responsive, genetically engineered clonal myoblasts in vitro and in vivo. *Exp. Cell Res.* 270, 138-150.
- Liu, C., Liu, X.J., Crowe, P.D., Kelner, G.S., Fan, J., Barry, G., Manu, F., Ling, N., DeSouza, E.B., Maki, R.A. (1999).** Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) codes for a growth factor that induces protein tyrosine phosphorylation. *Gene* 238, 471-478.
- Loewenstein, W.R., Kanno, Y. (1966).** Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J. Cell Biol.* 33, 225-234.
- Loewenstein, W.R., Kanno, Y., Ito, S. (1966).** Permeability of nuclear membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 137, 708-716.
- Loewenstein, W.R. (1987).** The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* 48, 725-726.
- Lyden, T.W., Anderson, C.L., Robinson, J.M. (2002).** The endothelium but not the syncytiotrophoblast of human placenta expresses caveolae. *Placenta* 23, 640-652.
- Mackay, D., Ionides, A., Kibar, Z., Rouleau, G., Berry, V., Moore, A., Shiels, A., Bhattacharya, S. (1999).** Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1357-1364.
- Maillard, M., Cadot, B., Ball, R.Y., Sethia, K., Edwards, D.R., Perbal, B., Taoud, R. (2001).** Differential expression of the ccn3 (nov) protooncogene in human prostate cell lines and tissues. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 54, 275-280.
- Makowski, L., Caspar, D.L.D., Phillips, W.C., Goodenough, D.A. (1977).** Gap junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* 74, 629-645.
- Manara, M.C., Perbal, B., Benini, S., Strammiello, R., Cerisano, V., Perdichizzi, S., Serra, M., Astolfi, A., Bertoni, F., Alami, J., Yeger, H., Picci, P., Scotlandi, K. (2002).**

- The expression of *ccn3* (*nov*) gene in musculoskeletal tumors. *Am. J. Pathol.* 160, 849-859.
- Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M.G., Peér, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., Hendrix, M.J.C. (1999).** Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and vitro: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* 155, 739-761.
- Mareel, M., Kint, J., Meyvisch, C. (1979).** Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vitro. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 30, 95-111.
- Martinerie, C., Gicquel, C., Louvel, A., Laurent, M., Schofield, P.N., Bouc, Y.L. (2001).** Altered expression of *novH* is associated with human adrenocortical tumorigenesis. *J. Clin. Endo. Metab.* 86, 3929-3940.
- McDonald, D.M., Munn, L., Jain, R.K. (2000).** Vasculogenic mimicry: How convincing, how novel, and how significant? *Am. J. Pathol.* 156, 383-388.
- McLeod, T.L., Bechberger, J.F., Naus, C.C.G. (2001).** Determination of a potential role of the CCN family of growth regulators in connexin43 transfected C6 glioma cells. *Cell Commun. Adhes.* 8, 441-445.
- Mehta, P.P., Hotz-Wagenblatt, A., Rose, B., Shalloway, D., Loewenstein, W.R. (1991).** Incorporation of the gene for a cell-cell-channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J. Membr. Biol.* 124, 207-225.
- Mesnil, M., Krutovskikh, V., Piccoli, C., Elf gang, C., Traub, O., Willecke, K., Yamasaki, H. (1995).** Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res.* 55, 629-639.
- Metz, J., Weihe, E., Heinrich, D. (1979).** Intercellular junctions in the full term human placenta I. Syncytiotrophoblastic layer. *Anat. Embryol.* 158, 41-50.
- Metz, J., Weihe, E. (1980).** Intercellular junction in the full term human placenta II. Cytotrophoblast cells, intravillous stroma cells and blood vessels. *Anat. Embryol.* 158, 167-173.
- Montesano, R., Pepper, M.S., Mohle-Steinlein, U., Risau, W., Wagner, E.F., Orci, L. (1990).** Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* 62, 435-445.
- Moorby, C.D. (2000).** A connexin 43 mutant lacking the carboxyl domain inhibits growth and motility of mouse 3T3 fibroblasts. *Mol. Carcinog.* 28, 23-30.
- Moorby, C., Patel, M. (2001).** Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp. Cell Res.* 271, 238-248.
- Morley, G.E., Taffet, S.M., Delmar, M. (1996).** Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys. J.* 70, 1294-1302.
- Mühlhauser, J., Crescimanno, C., Kaufmann, P., Hofler, H., Zaccheo, D., Castelucci, M. (1993).** Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 165-173.
- Müller, A., Gottwald, M., Tudyka, T., Linke, W., Klaus, W., Dhein, S. (1997).** Increase in gap junction conductance by an antiarrhythmic peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 327, 65-72.
- Mumm, J.S., Kopan, R. (2000).** Notch signaling: From the outside in. *Dev. Biol.* 228, 151-165.
- Muramatsu, A., Iwai, M., Morikawa, T., Tanaka, S., Mori, T., Harada, Y., Okanoue T. (2002).** Influence of transfection with connexin 26 gene on malignant potential of human hepatoma cells. *Carcinogenesis* 23, 351-358.
- Murphy, D. (2002).** Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects. *Adv. Physiol. Educ.* 26, 256-270.
- Nishimura, T., Lu, Y., Feng, X., Winterhager, E., Lye, S.J. (2003).** Gap Junctions are required for trophoblast proliferation in early human placental development. *Placenta*, zur Veröffentlichung eingereicht.
- Ober, W.B., Edgcomb, J.H., Price, E.B. (1971).** The pathology of choriocarcinoma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 179, 299-321.
- Ohlsson, R. (1989).** Growth factors, protooncogenes and human placental development. *Cell Differ. Dev.* 28, 1-15.

- Omori, Y., Yamasaki, H. (1998).** Mutated connexin43 protein inhibit rat glioma cell growth suppression mediated by wild-type connexin43 in a dominant-negative manner. *Int. J. Cancer* 78, 446-453.
- Pattillo, R.A., Gey, G.O., Delfs, E., Mattingly, R.F. (1968).** Human hormone production in vitro. *Science* 159, 1467-1469.
- Paul, D.L. (1986).** Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103, 123-134.
- Paul, D.L. (1995).** New functions for gap junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 665-672.
- Pauli, B.U., Augustin-Voss, H.G., El-Sabban, M.E., Johnson, R.C., Hammer, D.A. (1990).** Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 175-189.
- Perbal, B. (1999).** Nuclear localisation of NOVH protein: a potential role for NOV in the regulation of gene expression. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 52, 84-91.
- Perbal, B., Martinerie, C., Sainson, R., Werner, M., He, B., Roizman, B. (1999).** The c-terminal domain of the regulatory protein NOVH is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: a clue for a role of NOVH in cell-adhesion signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 869-874.
- Perbal, B. (2001).** NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 54, 57-79.
- Perkins, G.A., Goodenough, D.A., Sosinsky, G.E. (1997).** Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophys. J.* 72, 533-544.
- Pestell, R.G., Hollenberg, A.N., Albanese, C., Jameson, J.L. (1994).** C-Jun represses transcription of the human chorionic gonadotropin alpha and beta genes through distinct types of CREs. *J. Biol. Chem.* 269, 31090-31096.
- Phelan, P., Bacon, J.P., Davies, J.A., Stebbings, L.A., Todman, M.G., Avery, L., Baines, R.A., Barnes, T.M., Ford, C., Hekimi, S., Lee, R., Shaw, J.E., Starich, T.A., Curtin, K.D., Sun, Y.A., Wyman, R.J. (1998).** Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet.* 14, 348-349.
- Phelan, P., Starich, T.A. (2001).** Innexins get into the gap. *Bioessays* 23, 388-396.
- Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J.-S., Lamers, W.H., Evert, M., Meda, P., Traub, O., Willecke, K. (2000).** Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr. Biol.* 10, 1083-1091.
- Plum, A., Winterhager, E., Pesch, J., Lautermann, J., Hallas, G., Rosentreter, B., Traub, O., Herberhold, C., Willecke, K. (2001).** Connexin31-deficiency in mice cause transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev. Biol.* 15, 334-347.
- Princen, F., Robe, P., Gros, D., Jarry-Guichard, T., Gielen, J., Merville, M.P., Bours, V. (2001).** Rat gap junction connexin30 inhibits proliferation of glioma cell lines. *Carcinogenesis* 22, 507-513.
- Qiao, J., Doubrovin, M., Sauter, B.V., Huang, Y., Guo, Z.S., Balatoni, J., Akhurst, T., Blasberg, R.G., Tjuvajev, J.G., Chen, S.H., Woo, S.L. (2002).** Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Ther.* 9, 168-175.
- Qu, G.-Z., Ehrlich, M. (1999).** Demethylation and expression of methylated plasmid DNA stably transfected into HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 27, 2332-2338.
- Razin, A., Cedar, H. (1991).** DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.* 55, 451-458.
- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., Rossant, J. (1995).** Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1840.
- Reichert, M., Müller, T., Hunziker, W. (2000).** The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of madin-darby canine kidney I cells. *J. Biol. Chem.* 275, 9492-9500.
- Reuss, B., Hellmann, P., Dahl, E., Traub, O., Butterweck, A., Grümmer, R., Winterhager, E. (1996).** Connexins and E-cadherin are differentially expressed during trophoblast invasion and placenta differentiation in the rat. *Dev. Dynamics* 205, 172-182.

- Reuss, B., Hellmann, P., Traub, O., Butterweck, A., Winterhager, E. (1997). Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev. Genet.* 21, 82-90.
- Ross, J. (1996). Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends Genet.* 12, 171-175.
- Rossant, J., Cross, J.C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* 2, 538-548.
- Rütz, M.-L., Hülser, D.F. (2001). Supramolecular dynamics of gap junctions. *Eur. J. Cell Biol.* 80, 20-30.
- Saez, J.C., Spray, D.C., Nairn, A.C., Hertzberg, E.L., Greengard, P., Bennett, M.V.L. (1986). cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2473-2477.
- Safranyos, R.G., Caveney, S., Miller, J.G., Petersen, N.O. (1987). Relative roles of gap junction channels and cytoplasm in cell-to-cell diffusion of fluorescent tracers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2272-2276.
- Saito, T., Barbin, A., Omori, Y., Yamasaki, H. (1997). Connexin 37 mutations in rat hepatic angiosarcomas induced by vinyl chloride. *Cancer Res.* 57, 376-377.
- Sakamoto, K., Yamaguchi, S., Ando, R., Miyawaki, A., Kabasawa, Y., Takagi, M., Li, C.L., Perbal, B., Katsube, K. (2002). The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 29399-29405.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). „Molecular cloning: A laboratory manual.“ Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saunders, M.M., Seraj, M.J., Li, Z., Zhou, Z., Winter, C.R., Welch, D.R., Donahue, H. J. (2001). Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res.* 61, 1765-1767.
- Scholz, G., Martinerie, C., Perbal, B., Hanafusa, H. (1996). Transcriptional down regulation of the *nov* proto-oncogene in fibroblasts transformed by p60^{v-src}. *Mol. Cell Biol.* 16, 481-486.
- Schubert, A.-L., Schubert, W., Spray, D.C., Lisanti, M.P. (2002). Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41, 5754-5764.
- Shibata, T., Nagaysu, H., Hamada, J., Konaka, S., Hosokawa, M., Kawano, T., Kitajo, H., Arisue, M. (2000). Inhibitory effects of malotilate on in vitro invasion of lung endothelial cell monolayer by human oral squamous cell carcinoma cells. *Tumour Biol.* 21, 299-308.
- Silver, B.J., Bokar, J.A., Virgin, J.B., Vallen, E.A., Milsted, A., Nilson, J.H. (1987). Cyclic AMP regulation of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene is mediated by an 18-base-pair element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 21198-21202.
- Simon, A.M., Goodenough, D.A. (1998). Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* 8, 477-483.
- Söhl, G., Eiberger, J., Jung, Y.T., Kozak, C.A., Willecke, K. (2001). The mouse gap junction gene connexin29 is highly expressed in sciatic nerve and regulated during brain development. *Biol. Chem.* 382, 973-978.
- Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M., Cantley, L.C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77.
- Sosinsky, G.E. (1995). Mixing of connexins in gap junction membrane channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9210-9214.
- Spray, D.C., Burt, J.M. (1990). Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am. J. Physiol.* 258, C195-C205.
- Stauffer, K.A. (1995). The gap junction proteins β_1 -connexin (connexin-32) and β_2 -connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J. Biol. Chem.* 270, 6768-6772.
- Steinberg, T.H., Civitelli, R., Geist, S.T., Robertson, A.J., Hick, E., Veenstra, R.D., Wang, H.Z., Warlow, P.M., Westphale, E.M., Laing, J.G., Beyer, E.C. (1994). Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* 13, 744-750.

- Stewart, W.W. (1978).** Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a high fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* 14, 741-759.
- Strickland, S., Richards, W.G. (1992).** Invasion of the trophoblast. *Cell* 71, 355-357.
- Swenson, K.I., Jordan, J.R., Beyer, E.C., Paul D.L. (1989).** Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs. *Cell* 57, 145-155.
- Szulman, A.E., Buchsbaum, H.J. (1987).** Gestational trophoblastic disease. Springer Verlag, New York.
- Takamizawa, H., Sekiya, S. (1984).** Cell biology of choriocarcinoma. *Asia-Oceania J. Obst. Gynecol.* 10, 245-256.
- Tarrade, A., Kuen, R.L., Malassine, A., Tricottet, V., Blain, P., Vidaud, M., Evain-Brion, D. (2001).** Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab. Invest.* 81, 1199-1211.
- Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H.-D., Nelles, E., Schwarz, M., Willecke, K. (1997).** High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.* 7, 713-716.
- Tet-Off™ and Tet-On™ Gene Expression Systems.** User manual, PT-3001-1, Clontech, Seite 6.
- Teubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Söhl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J.-P., Petit, C., Willecke, K. (2003).** Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.* 12, 13-21.
- Thönnissen, E., Rabionet, R., Arbones, M.L., Estivill, X., Willecke, K., Ott, T. (2002).** Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. *Hum. Genet.* 111, 190-197.
- Tomasetto, C., Neveu, M.J., Daley, J., Horan, P.K., Sager, R. (1993).** Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J. Cell Biol.* 122, 157-167.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M. (1998).** Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 12725-12731.
- Toyofuku, T., Akamatsu, Y., Zhang, H., Kuzuya, T., Tada, M., Hori, M. (2001).** c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 1780-1788.
- Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brummer, F., Hülser, D.F., Willecke, K. (1989).** Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J. Cell Biol.* 108, 1039-1051.
- Traub, O., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Elf gang, C., Bastide, B., Scheidtmann, K.H., Hülser, D.F., Willecke, K. (1994).** Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 101-112.
- Trosko, J.E., Chang, C.C., Madhukar, B.V., Klaunig, J.E. (1990).** Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: An integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology* 58, 265-278.
- Valiunas, V., Beyer, E.C., Brink, P.R. (2002).** Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ. Res.* 91, 104-111.
- Van Rijen, H.V.M., Van Kempen, M.J.A., Analbers, L.J.S., Rook, M.B., Van Ginneken, A.C.G., Gros, D., Jongsma, H.J. (1997).** Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contains multiple connexins. *Am. J. Physiol.* 272, C117-C130.
- Vaney, D.I. (1991).** Many diverse types of retinal neurones show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin. *Neurosci. Lett.* 125, 187-190.
- Veenstra, R.D., DeHaan, R.L. (1986).** Measurement of single channel currents from cardiac gap junctions. *Science* 233, 972-974.
- Vine, A.L., Bertram, J.S. (2002).** Cancer chemoprevention by connexins. *Cancer Metastasis Rev.* 21, 199-216.

- Von Ostau, C. (1997).** Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von Gap-junction Connexinen während der Entwicklung der humanen Plazenta und im männlichen Chorionkarzinom. Dissertation, Universität Essen.
- Wahab, N.A., Brinkman, H., Mason, R.M. (2001).** Uptake and intracellular transport of the connective tissue growth factor: a potential mode of action. *Biochem. J.* 359, 89-97.
- Weiss, L., Orr, F.W., Honn, K.V. (1989).** Interactions between cancer cells and the microvasculature: a rate-regulator for metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 7, 127-167.
- White, T.W., Bruzzone, R., Wolfram, S., Paul, D.L., Goodenough, D.A. (1994).** Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J. Cell Biol.* 125, 879-892.
- White, T.W., Paul, D.L., Goodenough, D.A., Bruzzone, R. (1995).** Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol. Biol. Cell* 6, 459-470.
- Wice, B., Menton, D., Geuze, H., Schwartz, A.L. (1990).** Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp. Cell Res.* 186, 306-316.
- Wilgenbus, K.K., Kirkpatrick, C.J., Knuechel, R., Willecke, K., Traub, O. (1992).** Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer* 51, 522-529.
- Willecke, K., Haubrich, S. (1996).** Connexin expression systems: To what extent do they reflect the situation in the animal? *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 319-326.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., Söhl, G. (2002).** Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383, 725-737.
- Winterhager, E., Stutenkemper, R., Traub, O., Beyer, E., Willecke, K. (1991).** Expression of different connexin genes in rat uterus during decidualization and at term. *Eur. J. Cell Biol.* 55, 133-142.
- Winterhager, E., Grümmer, R., Jahn, E., Willecke, K., Traub, O. (1993).** Spatial and temporal expression of cx26 and cx43 in rat endometrium during trophoblast invasion. *Dev. Biol.* 157, 399-409.
- Winterhager, E., von Ostau, C., Grümmer, R., Traub, O., Kaufmann, P. (1999).** Connexin expression patterns in human trophoblast cells during placental development. *Placenta* 20, 627-638.
- Winterhager, E., Kaufmann, P., Grümmer, R. (2000).** Cell-cell-communication during placental development and possible implications for trophoblast proliferation and differentiation. *Placenta* 21, Supplement A, *Trophoblast Research* 14, S61-S68.
- Wortis, H.H. (1971).** Immunological responses of 'nude' mice. *Clin. Exp. Immunol.* 8, 305-317.
- Wu, J.-C., Tsai, R.Y., Chung, T.-H. (2003).** Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J. Cell Biochem.* 88, 823-835.
- Yagel, S., Parhar, R.S., Jeffrey, J.J., Lala, P.K. (1988).** Normal nonmetastatic human trophoblast cells share in vitro invasive properties of malignant cells. *J. Cell Physiol.* 136, 455-462.
- Yagel, S., Khokha, R., Denhardt, D.T., Kerbel, R.S., Parhar, R.S., Lala, P.K. (1989).** Mechanisms of cellular invasiveness: a comparison of amnion invasion *in vitro* and metastatic behaviour *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 768-775.
- Yamasaki, H. (1991).** Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. *Env. Health Persp.* 93, 191-197.
- Yamasaki, H., Mesnil, M., Omori, Y., Mironov, N., Krutovskikh, V. (1995).** Intercellular communication and carcinogenesis. *Mut. Res.* 333, 181-188.
- Yamasaki, H., Naus, C.C.G. (1996).** Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 17, 1199-1213.
- Yamasaki, H., Omori, Y., Krutovskikh, V., Zhu, W., Mironov, N., Yamakage, K., Willecke, K. (1999).** Connexins in tumor suppression and cancer therapy. In „Gap junction-mediated intercellular signalling in health and disease.“ Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 219), 241-260.

- Yano, T., Yamasaki, H. (2001).** Regulation of cellular invasion and matrix metalloproteinase activity in HepG2 cells by connexin 26 transfection. *Mol. Carcinog.* 31, 101-109.
- Youakim, A., Ahdieh, M. (1999).** Interferon- γ decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am. J. Physiol.* 276, G1279-G1288.
- Yudate, T., Isaka, K., Suzuki, Y., Takada, J., Hosaka, M., Shiraishi, K., Nohira, T., Shimizu, R., Takayama, M. (1995).** mRNA expression and protein localization of placental tissue protein 11, 12, 19 in gynecologic malignant tumors. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 47, 1248-1254.
- Yue, H., Eastman, P.S., Wang, B.B., Minor, J., Doctolero, M.H., Nuttall, R.L., Stack, R., Becker, J.W., Montgomery, J.R., Vainer, M., Johnston, R. (2001).** An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res.* 29, 1-9.
- Zhang, J.T., Nicholson, B.J. (1989).** Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J. Cell Biol.* 109, 3391-3401.
- Zhang, Z.Q., Zhang, W., Wang, N.Q., Bani-Yaghoub, M., Lin, Z.X., Naus, C.C.G. (1998).** Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis* 19, 1889-1894.
- Zhou, Y., Fisher, S.J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., Damsky, C.H. (1997).** Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* 99, 2139-2151.
- Zhu, D., Caveney, S., Kidder, G.M., Naus, C.C.G. (1991a).** Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: Analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1883-1887.
- Zhu, D., Cheng, C.F., Pauli, B.U. (1991b).** Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9568-9572.
- Zhu, D., Kidder, G.M., Caveney, S., Naus, C.C.G. (1992).** Growth retardation in glioma cells cocultured with cells overexpressing a gap junction protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10218-10221.
- Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C.G., Homer, R.J., Elias, J.A. (2002).** Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 121-128.
- Ziambaras, K., Lecanda, F., Steinberg, T.H., and Civitelli, R. (1998).** Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* 13, 218-228.

8 Anhang

8.1 Plasmidkarten der Vektoren

Zur Verfügung gestellte Vektoren

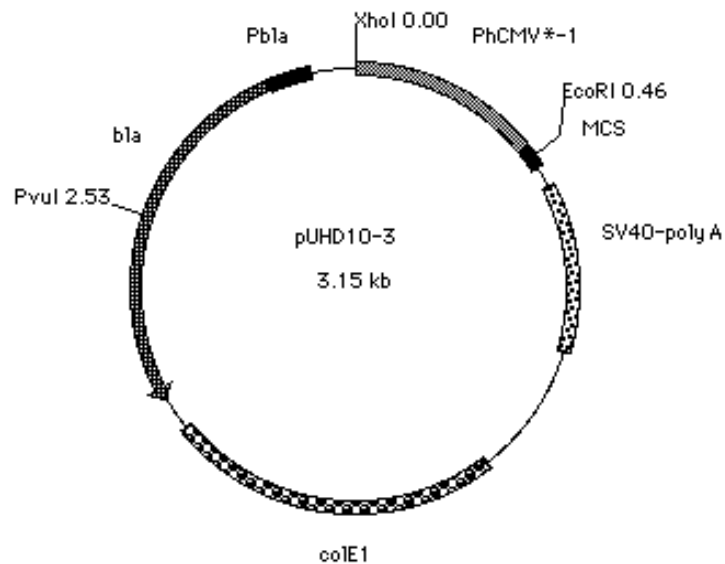


Abb. 35: pUHD10-3 (Größe: 3,15 kb)
 reverser Transaktivator (rtTA) ansprechender Basisvektor mit induzierbarem Tet-Promotor (P_{mCMV}) und einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995)

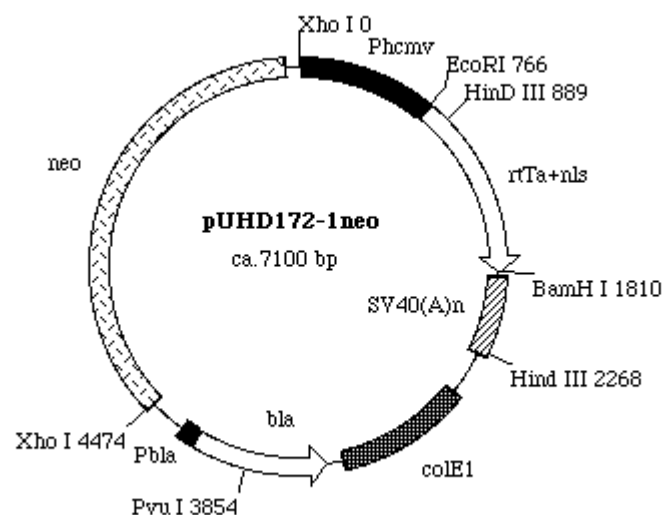


Abb. 36: pUHD172-1neo (Größe: 7,1 kb)
Insert: reverser Transaktivator (rtTA) und G418-Resistenzgen (neo) (Gossen et al., 1995)

Generierte Vektoren

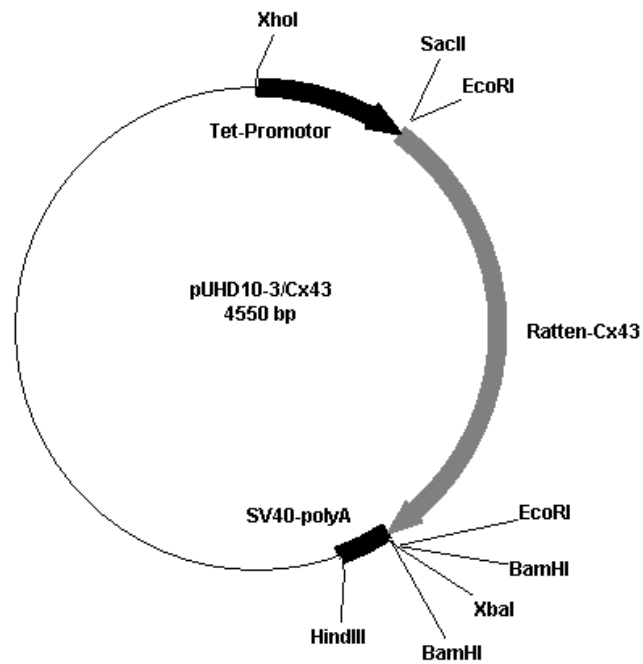


Abb. 37: pUHD10-3/Cx43 (Größe: 4,55 kb)

Basisvektor: pUHD10-3 (Größe: 3,15 kb)

Insert: 1,4 kb großes Ratten-Cx43-Fragment (Beyer et al., 1987) aus Vektor pPH4 (Hellmann, 1995)

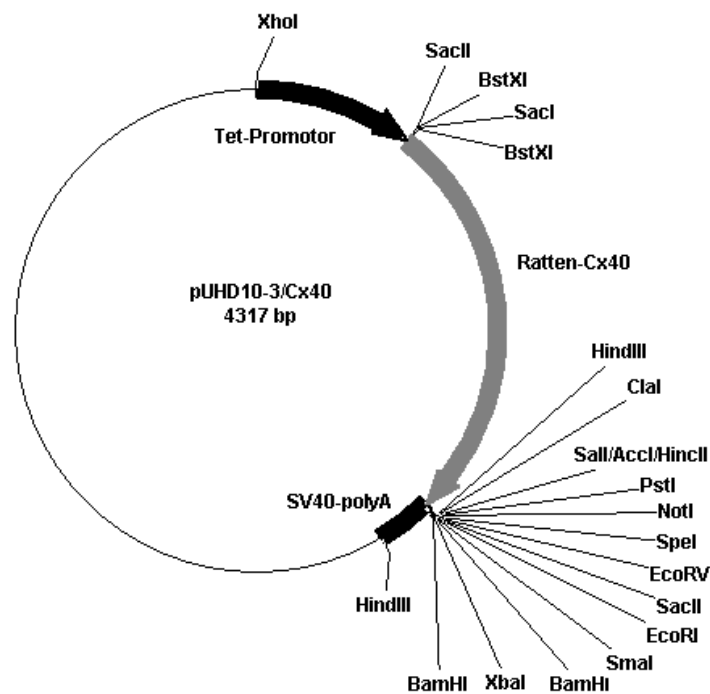


Abb. 38: pUHD10-3/Cx40 (Größe: 4,317 kb)

Basisvektor: pUHD10-3 (Größe: 3,15 kb)

Insert: 1,164 kb großes Ratten-Cx40-Fragment aus Vektor pPH3 (Hellmann et al., 1996)

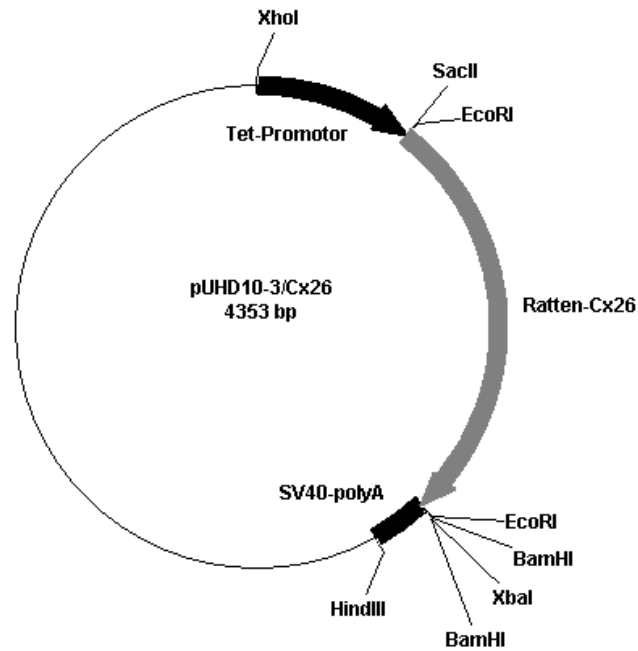


Abb. 39: pUHD10-3/Cx26 (Größe: 4,353 kb)

Basisvektor: pUHD10-3 (Größe: 3,15 kb)

Insert: 1,2 kb großes Ratten-Cx26-Fragment (Zhang und Nicholson, 1989) aus Vektor pPH9 (Hellmann et al., 1999)

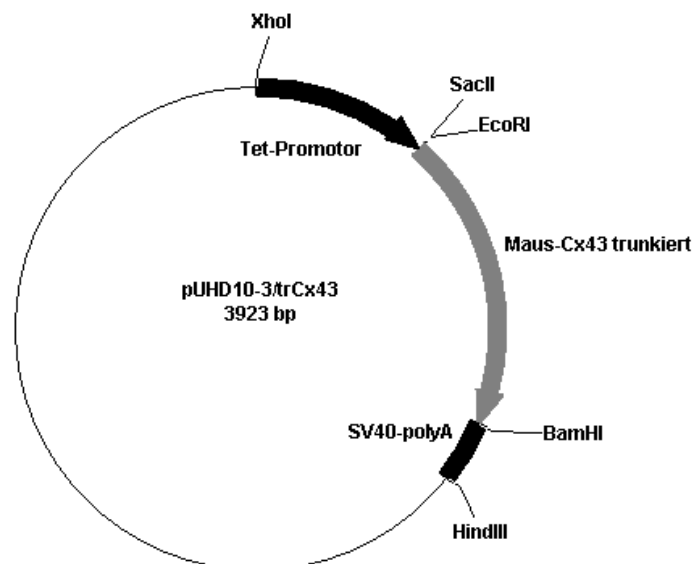


Abb. 40: pUHD10-3/trCx43 (G172) (Größe: 3,923 kb)

Basisvektor: pUHD10-3 (Größe: 3,15 kb)

Insert: 771 bp großes Maus-Cx43 trunkiertes Fragment (Cx43 ohne den größten Teil des C-Terminus) aus Vektor G172 (trCx43) (K. Maass, Bonn)

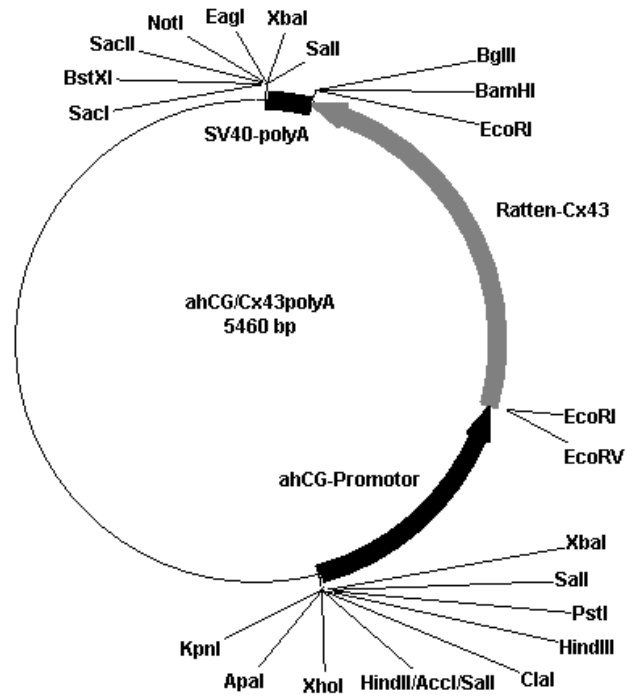


Abb. 41: α hCG/Cx43polyA (Größe: 5,46 kb)

Basisvektor: pBluescript SK +/- (Größe: 2,96 kb)

Insert: 1,56 kb großes Ratten-Cx43-Fragment aus Vektor pPH4 (Hellmann et al., 1999) mit 900 bp großem α hCG-Promotor aus Vektor pA3 luc (α hCG-Promotor).

8.2 Zusammenstellung der Nacktmausversuche zur Analyse des Tumorstwachstums

Tab. 7: Zusammenstellung der Experimente zum Wachstumsverhalten der Jeg3-Cx-Transfektanten in der Nacktmaus. +D: + Dox, -D: - Dox, re: rechte Flanke, li: linke Flanke.

Versuchsansatz: rechte Flanke (re): Cx-Transfektante linke Flanke (li): Vektorkontrolle	Anzahl Tiere	Anzahl Tumore gesamt	Anzahl Tiere mit Tumorstvolumen re kleiner li	Anzahl Tiere mit Tumorstvolumen re größer li	Anzahl Tiere mit einseitiger, keiner Tumorstbildung oder re und li gleichem Tumorstvolumen
αhCG/Cx43/#2	14	re 13 li 13	10	2	2
Tet/Cx43/#36 +D	12	re 11 li 12	8	2	2
Tet/Cx43/#36 -D	10	re 8 li 8	2	4	4
Tet/Cx43/#20 +D	10	re 8 li 10	7	1	2
Tet/Cx43/#20 -D	12	re 10 li 11	3	5	4
Tet/Cx43/#48 +D	7	re 3 li 6	3	-	4
Tet/Cx40/#13 +D	14	re 8 li 12	2	4	8
Tet/Cx40/#13 -D	14	re 12 li 14	4	7	3
Tet/Cx40/#19 +D	11	re 9 li 9	3	4	4
Tet/Cx40/#19 -D	11	re 7 li 7	3	1	7
Tet/Cx40/#9 +D	8	re 5 li 7	3	1	4
Tet/trCx43/#16 +D	9	re 7 li 8	2	5	2
Tet/trCx43/#16 -D	9	re 4 li 7	3	1	5
Tet/trCx43/#41 +D	6	re 5 li 4	2	1	3

8.3 Genlisten der Gene-Array-Auswertungen

Tab. 8: Weitere hoch- und herunterregulierte Gene in Tet/Cx43- (A), Tet/Cx40- (B) und Tet/trCx43-Transfektanten (C) + versus - Dox nach 9 multiplen Paarvergleichen der Gene-Array-Daten. Es sind nur die Gene aufgeführt, die in bis zu drei Vergleichen reguliert und in bis zu einem Vergleich in die andere Richtung reguliert waren. Filter: *fold change*: > 1,5 bzw. < -1,5 und *change p-value*: < 0,001 bzw. > 0,999. Es sind jeweils die Anzahl der Vergleiche hoch- versus herunterreguliert und die Änderung der Genexpression (*fold change*) im Durchschnitt als xfach erhöht bzw. erniedrigt dargestellt. ↑ Hochregulation, ↓ Herunterregulation, dunkelgrau unterlegt: Gene, die im Mann-Whitney-Test signifikant reguliert waren ($p \leq 0,05$).

A Jeg3-Tet/Cx43 + versus – Dox			
Hochregulierte Gene			
Genbank-Nummer	Gen-Bezeichnung	9 Einzelvergleiche hoch- / herunterreguliert	<i>fold change</i>
D43638	MTG8a protein	3/0	7,8 ↑
AF030234	splicing factor Sip1	3/0	1,8 ↑
L32164	zinc finger protein	3/0	10,7 ↑
X54134	HPTP epsilon mRNA for protein tyrosine phosphatase epsilon	3/0	13,5 ↑
S62138	TLS/CHOP=hybrid gene {translocation breakpoint}	3/1	3,6 ↑
N50520	similar to Cytochrom C oxidase subunit VIIb (COX7B), EST	3/1	1,8 ↑
Herunterregulierte Gene			
AC004990	PAC clone DJ1185I07	0/3	11 ↓
AI743134	similar to Glia derived nexin precursor , EST	1/3	2,4 ↓
AJ000388	calpain-like protease CANPX	1/3	1,7 ↓
B Jeg3-Tet/Cx40 + versus – Dox			
Hochregulierte Gene			
AF055001	HERPUD1, homocysteine-inducible protein, EST	4/1	2,3 ↑
S62138	TLS/CHOP=hybrid gene {translocation breakpoint}	4/1	2 ↑
U59185	monocarboxylate transporter (MCT)	4/1	1,7 ↑
AB006537	interleukin 1 receptor accessory protein	4/1	2,3 ↑
D84111	RBP-MS/type 5, RNA binding protein	4/1	1,7 ↑
M59830	MHC class III HSP70-2 gene (HLA)	4/1	5,3 ↑
M11717	heat shock protein (hsp 70)	4/1	3,2 ↑
X66360	PCTAIRE-2 for serine/threonine protein kinase	3/0	1,7 ↑
X96783	Syt V, Synaptotagmin	3/0	2,2 ↑
Y00451	5-aminolevulinate synthase	3/0	2,1 ↑
AL080081	microvascular endothelial differentiation gene product 1, EST	3/0	1,9 ↑
Z35491	novel glucocorticoid receptor-associated protein	3/0	1,9 ↑
AB023186	KIAA0969 protein	3/0	2,1 ↑
U80017	basic transcription factor 2 p44 (btf2p44)	3/0	2 ↑
S68271	CREM=cyclic AMP-responsive element modulator	3/0	1,7 ↑
M77810	Human transcription factor GATA-2	3/0	1,6 ↑
U54778	14-3-3 epsilon protein	3/0	2 ↑
Herunterregulierte Gene			
AL021155	Brain Natriuretic Protein BNP	0/4	6,5 ↓
X91220	Na-Cl electroneutral thiazide-sensitive cotransporter	1/4	2,6 ↓
AJ238246	Sarcolectin	0/3	1,8 ↓
AL038662	Nm23 protein, EST	0/3	1,8 ↓
J02611	apolipoprotein D	0/3	13,7 ↓
D21261	KIAA0120 protein	0/3	2 ↓
AB008109	RGS5, regulator of G-protein signalling (RGS) proteins	0/3	6,3 ↓
AF056087	frizzled related protein	0/3	2,2 ↓
X73066	NM23-H1, metastasis suppressor	0/3	1,7 ↓
U30521	P311 HUM (3.1), brain specific protein	1/3	2,6 ↓
AF002697	E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3	1/3	1,8 ↓
X81789	splicing factor SF3a60	1/3	1,7 ↓
X92720	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1/3	2,2 ↓

Tab. 8: Fortsetzung

C Jeg3-Tet/trCx43 + versus – Dox			
Hochregulierte Gene			
Genbank-Nummer	Gen-Bezeichnung	9 Einzelvergleiche hoch- / herunterreguliert	fold change
M26683	interferon gamma treatment inducible protein	3/0	3,6 ↑
M29960	steroid receptor (TR2-11)	3/0	2 ↑
AI198311	Neuropeptide precursor, EST	3/0	8,8 ↑
AI130910	translocase of outer mitochondrial membrane 34 (TOMM34), EST	3/0	2 ↑
AF030234	splicing factor Sip1	3/0	2 ↑
M28225	JE gene encoding a monocyte secretory protein	3/0	2,9 ↑
X76648	glutaredoxin	3/0	2,7 ↑
AL049933	G-Protein, EST	3/0	1,8 ↑
AF032906	cathepsin Z precursor (CTSZ)	3/0	2,3 ↑
M35416	GTP-binding protein (RALB)	3/0	1,7 ↑
D50683	TGF-betaIIIR alpha	3/0	2,1 ↑
U12779	MAP kinase activated protein kinase 2	3/0	2,2 ↑
U88666	serine kinase SRPK2	3/0	3,1 ↑
M12886	T-cell receptor active beta-chain	3/0	1,7 ↑
U69609	transcriptional repressor (GCF2)	3/1	2,1 ↑
AB002370	KIAA0372	3/1	2 ↑
Herunterregulierte Gene			
W27184	cerebellar-degeneration-related antigen, EST	0/3	4,4 ↓
M16965	cerebellar degeneration-associated protein	0/3	14,6 ↓
U52100	XMP	0/3	1,8 ↓
L27560	insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)	0/3	5,6 ↓
L37747	lamin B1	1/3	1,6 ↓
M57230	membrane glycoprotein gp130	1/3	2,2 ↓
D86961	KIAA0206	1/3	1,8 ↓
M25915	complement cytolysis inhibitor (CLI), EST	1/3	2,2 ↓

Tab. 9: Weitere hoch- und herunterregulierte Gene in Cx43- versus Cx40-Transfektanten + Dox (A), Cx43- versus trCx43-Transfektanten + Dox (B) und Cx40- versus trCx43-Transfektanten + Dox (C) nach 9 multiplen Paarvergleichen der Gene-Array-Daten. Es sind nur die Gene aufgeführt, die in bis zu vier Vergleichen reguliert und in bis zu einem Vergleich in die andere Richtung reguliert waren. Filter: *fold change*: > 2,5 bzw. < -2,5 und *change p-value*: < 0,001 bzw. > 0,999. Es sind jeweils die Anzahl der Vergleiche hoch- versus herunterreguliert dargestellt. dunkelgrau unterlegt: Gene, die im Mann-Whitney-Test signifikant reguliert waren ($p \leq 0,05$).

A Jeg3-Tet/Cx43 + Dox versus Jeg3-Tet/Cx40 + Dox		
Hochregulierte Gene		
Genbank-Nummer	Gen-Bezeichnung	9 Einzelvergleiche hoch- / herunterreguliert
M12529	apolipoprotein E	5/0
AL021155	Brain Natriuretic Protein BNP	5/0
U76702	follicle-stimulating protein FLRG (FLRG)	5/1
U15932	dual-specificity protein phosphatase	4/0
Y18483	SLC7A8, amino acid transporter	4/0
AA522530	HIF-1 responsive RTP801, EST	4/0
AJ002962	hB-FABP, fatty acid binding protein	4/0
X97324	adipophilin, protein component of lipid storage droplets (LSDs)	4/0
U48807	MAP kinase phosphatase (MKP-2)	4/0
U37518	TNF-related apoptosis inducing ligand TRAIL	4/1
Herunterregulierte Gene		
AL035304	PAC 295C6	0/6
M57763	ADP-ribosylation factor (hARF6)	0/4
Y15227	leukemia associated gene 1	0/4
B Jeg3-Tet/Cx43 + Dox versus Jeg3-Tet/trCx43 + Dox		
Hochregulierte Gene		
AI743134	Glia derived nexin precursor, EST	5/0
U76702	follicle-stimulating protein FLRG (FLRG)	5/1
S70585	thyroid-stimulating hormone	4/0
M12529	apolipoprotein E	4/1
Herunterregulierte Gene		
U36610	Y-chromosome RNA recognition motif protein (YRRM)	0/5
AL035304	PAC 295C6	0/5
AB028974	KIAA1051	0/4
M77349	transforming growth factor-beta induced gene product (BIGH3)	0/4
X57352	1-8U gene from interferon-inducible gene	1/4

Tab. 9: Fortsetzung

C Jeg3-Tet/Cx40 + Dox versus Jeg3-Tet/trCx43 + Dox		
Hochregulierte Gene		
Genbank-Nummer	Gen-Bezeichnung	9 Einzelvergleiche hoch- / herunterreguliert
L34838	early placenta insulin-like peptide EPIL (INSL4)	6/0
AB008375	osteoblast specific cysteine-rich protein	5/0
X13589	aromatase (estrogen synthetase)	4/0
U34624	T cell surface glycoprotein CD-6	4/0
AI093155	G antigen, family C, 1 (GAGEC1)	4/0
Z97632	Uterine Bombesin Receptor, BRS-3, EST	4/0
U84971	fetal hypothetical protein (HSU84971), EST	4/0
X04470	antileukoprotease (ALP) from cervix uterus	4/0
D21241	cytochrome P-450 aromatase	4/0
J00117	chorionic gonadotropin (hcg) beta subunit	4/0
Herunterregulierte Gene		
AL096719	similar to profilin II, EST	0/6
AJ002962	hB-FABP	0/5
AL021155	Brain Natriuretic Protein BNP	0/4
M92357	B94	0/4
U3661	Y-chromosome RNA recognition motif protein (YRRM)	0/4
U35113	metastasis-associated mta1	0/4
X77956	Id1	1/4
Z19554	vimentin	1/4

Lebenslauf

Name:		Alexandra Gellhaus
Anschrift:		Gorch-Fock-Str. 12 26203 Wardenburg
Geburtsdatum:		04.10.1973
Geburtsort:		Oldenburg
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Familienstand:		ledig
Schulbildung:	1980 – 1984 1984 – 1986 1986 – 1993	Grundschule in Wardenburg Orientierungsstufe in Wardenburg Gymnasium in Oldenburg
Schulabschluß:	1993	Abitur
Studium:	1993 – 1999	Universität Oldenburg Diplomstudiengang Biologie <u>Thema der Diplomarbeit:</u> Identifizierung von Connexintranskripten in der Karpfenretina mittels RT-PCR
Studienabschluß:	1999	Diplom-Biologin
Doktorarbeit:	seit 09/1999	Biologie-Doktorandin am Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen bei Frau Prof. Dr. Elke Winterhager <u>Thema der Dissertation:</u> Einfluß verschiedener Gap Junction- Kanäle auf das Proliferations-, Invasions- und Differenzierungs- verhalten der humanen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3

Essen, den 08.04.2003

Alexandra Gellhaus

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Einfluß verschiedener Gap Junction-Kanäle auf das Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsverhalten der humanen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Alexandra Gellhaus befürworte.

Essen, den 08.04.2003

Prof. Dr. E. Winterhager

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 08.04.2003

Alexandra Gellhaus

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 08.04.2003

Alexandra Gellhaus